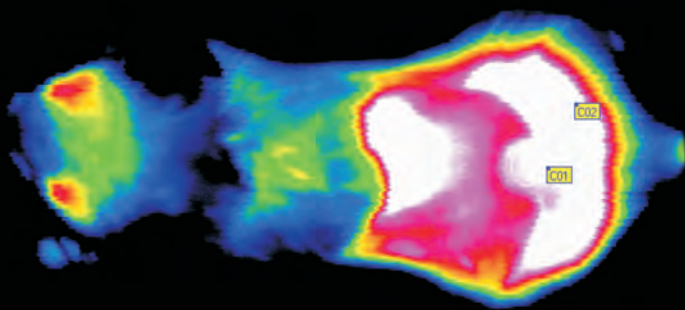


EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON WASSERGEFILTERTEM INFRAROT-A (WIRA) AUF DIE WUNDHEILUNG BEI DER JUNGEN UND ALTEN MAUS

VERA DELVENTHAL



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere, Chirurgie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Kramer
und
Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. M. Konerding

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von
wassergefiltertem Infrarot-A (wIRA) auf die Wundheilung
bei der jungen und alten Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Vera Delventhal

Tierärztin aus Ludwigshafen

Gießen (2009)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. M. Kramer

Prof. Dr. med. Moritz A. Konerding

Tag der Disputation: 5.11.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
Einleitung	7
1. Literaturübersicht	9
1.1 Einteilung von Wunden: akute versus chronische Wunden	9
1.2 Mechanismen der Wundheilung	11
1.3 Wundheilung und Alter	19
1.4 Infrarotstrahlung: historischer Abriss	20
1.4.1 Wasserfilterung	23
1.4.2 Wirkmechanismen	26
1.4.3 Bisherige wIRA Erfahrungen bei der Wundheilung	26
1.5 Zielsetzung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Versuchstiere	29
2.2 Vorversuche zur Ermittlung der Bestrahlungsstärke	29
2.3 Versuchsprotokoll	31
2.4 Operation und Narkose	33
2.5 Bestrahlungsprozedere	34
2.5.1 Bestrahlungsgerät	34
2.5.2 Gerät zur Messung der Bestrahlungsstärken	35
2.6 Dokumentationen	36
2.6.1 Erfassung der aktuellen Wundgrößen	36
2.6.2 Infrarotthermographie (IRT)	36
2.6.2.1 Infrarotkamera	37
2.6.2.2 IRT-Auswertung	38
2.7 Gewebeentnahme	39
2.8 Zug-Dehnungs-Zerreitest	40
2.9 Histologische Verfahren	41
2.10 Lichtmikroskopie	42
2.10.1 Schichtdicken	43
2.10.2 Kollagenfaseranteil	44

2.10.3	Gefäßdichtebestimmung	44
2.11	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Junge Mäuse	47
3.1.1	Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses	47
3.1.2	Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale Zugbelastbarkeit	50
3.1.3	Monitorierung der Bestrahlungseffekte durch Infrarotthermographie	51
3.1.4	Schichtdicken	55
3.1.5	Kollagenfasergehalt	58
3.1.6	Gefäßdichte	60
3.2	Alte Mäuse	63
3.2.1	Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses	63
3.2.2	Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale Zugbelastbarkeit	65
3.2.3	Monitorierung der Bestrahlungseffekte durch Infrarotthermographie	66
3.2.4	Schichtdicken	70
3.2.5	Kollagengehalt	73
3.2.6	Gefäßdichte	75
3.3	Junge und alte Mäuse im Vergleich	77
3.3.1	Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses	77
3.3.2	Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale Zugbelastbarkeit	78
3.3.3	Schichtdicken	80
3.3.4	Kollagengehalt	81
3.3.5	Gefäßdichte	84
4.	Diskussion	85
4.1	Tier- und Wundmodell	86
4.2	Bestrahlungsparameter	89
4.3	Wundverschlusszeiten unter wIRA	91
4.4	Mechanische Belastbarkeit nach wIRA	93
4.5	Wundmonitorierung mittels Infrarotthermographie	95

4.6	Schlussfolgerung	98
5.	Zusammenfassung	99
6.	Summary	102
7.	Literaturverzeichnis	104
8.	Anhang	116
8.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	116
8.2	Pikrin-Siriusrotfärbung	116
8.3	CD 31-Immunhistochemie	117
	Danksagungen	118
	Erklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
Balb/c	Mausstamm
b-FGF	basic fibroblast growth factor
B-WI-00	Braun Stiftung-Wound Healing Infrared-00
C	Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
bzw.	beziehungsweise
d	day (Tag)
db/db	diabetischer Phänotyp
DIN	Deutsches Institut für Normung
DIPO	Deutsches Institut für Pferdeosteopathie
DSI	Deutsches Sofia Institut
EGF	epidermal growth factor
EPC	endothelial progenitor/precursor cell
et al.	et alterii
F	force (Kraft)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GMS	German Medical Science
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hour (Stunde)
HE	Hämatoxilin-Eosin
H ₂ O	Wasser
ICR	Imprinting Control Region
Ig	Immunglobulin
IR	Infrarot

IRT	Infrarotthermographie
K	Kelvin
KG	Körpergewicht
KGF	keratinocyte growth factor
lat.	lateinisch
m	Meter
max.	maximal
MCP-1	monocyte chemoattractant protein
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHG	Millimeter Quecksilber
Mrd.	Milliarde
mW	Milliwatt
n	Anzahl
N	Newton
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
Op	Operation
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphat-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PC	personal computer
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PGF _{2α}	Prostaglandin F2alpha
qm	Mikrometer
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
s	Sekunde
s.	siehe
Strat. corn.	Stratum corneum
Strat. germinat.	Stratum germinativum
T	Temperatur
Tab.	Tabelle

TGF	transforming growth factor
tgl.	täglich
TNF	tumor necrosis factor
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs	versus
ver.	version
VIS	visuelles/sichtbares Licht
V.A.C.	vacuum assisted closure
W	Woche
wIRA	wassergefiltertes Infrarot A
z. B.	zum Beispiel

Einleitung

Die physiologische Wundheilung hängt von zahlreichen Faktoren und biochemischen Prozessen ab. Eine Grundvoraussetzung ist außerdem eine adäquate Sauerstoffversorgung und Energiebereitstellung. Sind die herrschenden Bedingungen wie Gewebetemperatur, Sauerstoffpartialdruck und Durchblutung z. B. aufgrund einer Grunderkrankung wie z. B. Diabetes mellitus nicht suffizient, kann es zu gravierenden Wundheilungsstörungen kommen. Ziel ist es deshalb, die Heilungssituation zu optimieren und das Infektionsrisiko zu minimieren.

Ein interessanter physikalischer Ansatz hierzu ist die Behandlung mit wassergefiltertem Infrarot-A (wIRA). Durch eine wassergefilterte Küvette werden der Infrarot-B und -C Anteil sowie die Wasserabsorptionsbanden innerhalb des Infrarot-A aus dem Strahlenbündel eliminiert und so die thermische Oberflächenbelastung der Haut deutlich verringert (Cobarg et al., 1995; Hellige et al., 1995). Die resultierende wIRA Strahlung kann ein therapeutisches Wärmefeld aufbauen und soll die Durchblutung und den Sauerstoffgehalt des behandelten Gewebes verbessern (Hellige et al., 1995; Vaupel und Stofft et al., 1995; Hartel et al., 2006).

Hartel et al. (2006) kann in einer humanmedizinischen Studie, in der er akute Abdominalwunden zweimal täglich mit wIRA bestrahlt, eine signifikant verbesserte Heilung in der Behandlungsgruppe nachweisen und die Wundinfektionsrate senken (Hartel et al., 2006). In der Veterinärmedizin findet wIRA zwar bereits punktuelle Anwendung, allerdings existieren keine Studien, die positive Effekte der wIRA Bestrahlung auf die Wundheilung belegen.

In der vorliegenden Arbeit sollen mögliche positive Effekte der wIRA Bestrahlung auf die Wundheilung in einem etablierten Defektwundenmodell in der Maus untersucht werden. Als primärer Endpunkt wird die „Time to Closure“ definiert. Unsere Hypothese ist, dass diese unter wIRA Bestrahlung kürzer sein wird als unter Scheinbestrahlung. Die zweite Hypothese ist, dass die Effekte bei sehr alten Tieren, unter der Annahme einer verzögerten Wundheilung, ausgeprägter sind.

Als sekundäre Endpunkte werden Schichtdicke, Gefäßdicke und Kollagengehalt festgelegt, um über eine Struktur-Funktions-Analyse die wIRA Wirkung aufzuklären. Die funktionelle Qualität des Narbengewebes wird mit einem biomechanischem Zug-Dehnungsversuch untersucht.

1. Literaturübersicht

Wunden sind durch einen Substanzverlust des Gewebes mit entsprechender Funktionseinschränkung gekennzeichnet. Der Organismus hat das Ziel, diesen Defekt möglichst schnell durch vernarbendes Bindegewebe und Epithelregeneration wieder zu verschließen. Die Wundheilung kann durch zwei verschiedene Mechanismen ablaufen: bei der sogenannten **Regeneration** findet ein gewebespezifischer Ersatz statt, der bei allen Epithelien (z. B. der Epidermis, Schleimhäute des Magen-Darm- oder Urogenitaltraktes) vollständig ist, bei parenchymatösen Organen dagegen nur eingeschränkt möglich ist. Bei allen anderen Geweben läuft hingegen eine **Reparation** ab: fehlendes Gewebe wird durch unspezifisches Binde- und Stützgewebe ersetzt. Es entsteht eine Narbe, die weder der ursprünglichen Gewebequalität entspricht, noch ihre vollständige Funktionalität wiederherstellt (z. B. Narbe nach Myokardinfarkt) (Krüger und Wolfrum, 2007).

1.1 Einteilung von Wunden: akute versus chronische Wunden

Je nach Entstehungsursache werden folgende Wundarten unterschieden:

akute Wunden:	- traumatische, unfallbedingte Wunden - iatrogene, z. B. operative Wunden
chronische Wunden:	- z. B. Dekubitalulzera, venöse und diabetische Ulzera

Traumatische Wunden lassen sich wiederum nach morphologischen und ätiologischen Kriterien klassifizieren. Ersteres unterscheidet die offene Verletzung mit Durchtrennung der Haut in unterschiedlichen Schweregraden (oberflächlich, penetrierend, kompliziert), die geschlossene Verletzung in Folge von stumpfer Gewalt, die Ablederung (Décollement) und die Amputation. Die ätiologische Einteilung hingegen erfolgt nach der Verletzungsursache, also mechanische, thermische, chemische, durch elektrischen Strom verursachte Verletzungen oder Strahlenschä

den. Iatrogene Wunden werden durch den Tierarzt oder Arzt selbst im Laufe einer Diagnosefindung oder Therapie gesetzt (z. B. Biopsie, Punktion, Operation) (Krüger und Wolfrum, 2007).

Chronische Wunden sind dagegen durch fehlende Heilung trotz adäquater Therapie charakterisiert. Die Ursachen liegen häufig in einer unzureichenden Versorgung der Haut mit Nährstoffen und Sauerstoff aufgrund von Durchblutungsstörungen oder hohem interstitiellem Druck, der wie beim venösen Ulkus, seinerseits verminderte Sauerstoffpartialdrücke bewirkt. Dies kann letztlich sogar zu Nekrosen führen (Krüger und Wolfrum, 2007).

Klinisch und histopathologisch kann der Wundheilungsvorgang in vier verschiedene Formen eingeteilt werden: bei der **primären Wundheilung** (*sanatio per primam intentionem*) sind glatte, adaptierte Wundränder mit guter Durchblutung und ein Wundgebiet frei von Fremdkörpern, Keimen und Nekrosen die Voraussetzung. Die Primärheilung findet in der Regel bei chirurgisch gesetzten Wunden statt. Bei allen anderen Wunden muss durch operative Versorgung ggf. nach Auffrischung der Wundränder (Débridement), erst die Voraussetzung für die primäre Wundheilung geschaffen werden. Das Heilungsergebnis ist dann eine schmale, strichförmige Narbe, die oft kaum sichtbar ist (Krüger und Wolfrum, 2007).

Anders verhält es sich bei der **sekundären Wundheilung** (*sanatio per secundam intentionem*): sie ist durch große Gewebedefekte und klaffende Wunden, die nicht mechanisch adaptiert werden, gekennzeichnet. Hier wird der Gewebeverlust durch Granulationsgewebe aufgefüllt, das später in Narbengewebe umgewandelt wird. Die Wundränder kontrahieren sich, dabei wird der Durchmesser der Wunde um 1-2 mm pro Tag reduziert (Asmussen und Söllner, 1993). Es kann Wochen dauern, bis das ursprüngliche Hautniveau erreicht ist und die Epithelialisierung beginnt. Die resultierende Narbe ist großflächig und aus kosmetischer Sicht unbefriedigend. Dies kann auch Funktionseinschränkungen vor allem im Bereich von Gelenken verursachen (Asmussen und Söllner, 1993).

Als **verzögerte Primärheilung** gilt, wenn bei Verdacht auf eine Kontamination die Wunde zunächst nicht verschlossen, sondern mit feuchter Gaze offengehalten wird.

Erst wenn weitere Hinweise auf eine Infektion ausbleiben, wird die Wunde dann nach 2-3 Tagen verschlossen, so dass die Primärheilung ungestört ablaufen kann.

Die **regenerative Wundheilung** nimmt eine Sonderstellung ein: sie findet bei oberflächlichen Hautwunden (z. B. Verbrennungen ersten und zweiten Grades, Hautabrasion), bei denen nur die Epidermis und eventuell geringe Anteile der Lederhaut betroffen sind, statt. Solange die Basalzellen bzw. die Basalmembran weitgehend intakt bleiben, kann sich die Epidermis vollständig regenerieren. Die Zellen migrieren aus der umgebenden Basalzellschicht aufeinander zu und durch kontinuierliche Teilung der neuen Epidermalzellen füllt sich der Defekt vom Grund her nach oben auf. Die oberen Zellschichten verhornen nach und nach (Asmussen und Söllner, 1993). Das Ergebnis ist ein Regenerat, das sich kaum von der umgebenden intakten Haut unterscheidet.

Eine **Heilung unter Schorf** kann bei primär wie auch bei sekundär heilenden Wunden vorkommen und ist als Schutz für das sich neu bildende Epithel sogar erwünscht. Allerdings kann der Schorf bei sekundär heilenden Wunden auch Probleme bereiten, wenn er den Sekretabfluss sowie die Granulationsgewebebildung behindert und damit die Heilung verzögert (Krüger und Wolfrum, 2007).

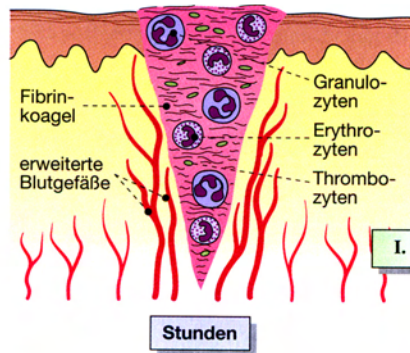
1.2 Mechanismen der Wundheilung

Die komplexen zellulären, molekularen und biochemischen Prozesse bei der Wundheilung lassen sich – vereinfacht dargestellt - in drei Hauptphasen einteilen: auf die Anfangsphase der Exsudation folgen Proliferation und Regeneration, die sich allerdings auch überlappen (Krüger und Wolfrum, 2007). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Wundheilungsphasen sowie ihren zeitlichen Verlauf bei der primären und sekundären Wundheilung.

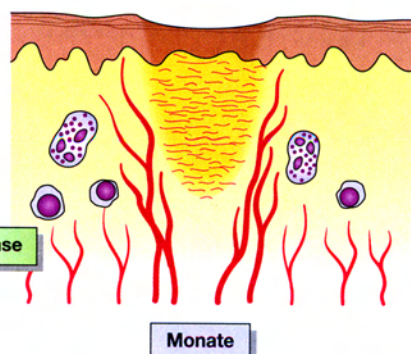
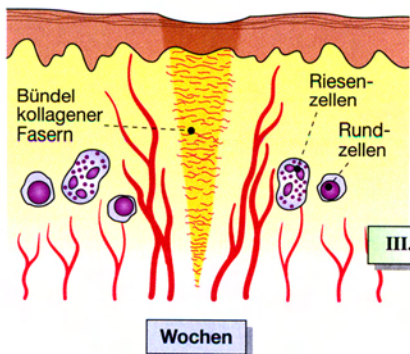
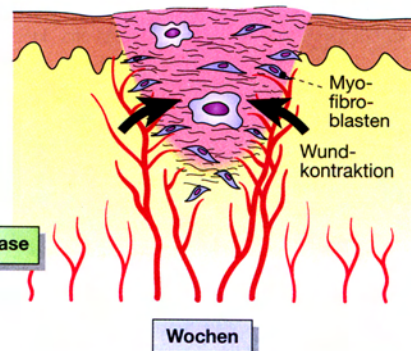
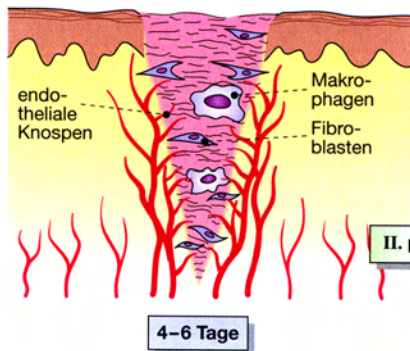
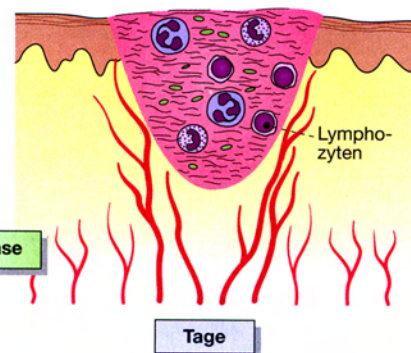
Exsudationsphase: Nach der anfänglichen Blutung, die als Nebeneffekt die Wunde säubert, kommt es im betroffenen Gebiet, ausgelöst durch Thromboxan A₂ und

Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus den Thrombozyten, nach wenigen Sekunden zu einer kurzfristigen Vasokonstriktion, die die primäre Blutung reduziert (Asmussen und Söllner, 1993). Nach einer Phase von wenigen Minuten wird durch eine Vasodilatation eine Mehrdurchblutung des Gewebes erreicht. Histamin und Serotonin aus den elektronendichten Granula der Thrombozyten sorgen außerdem für eine erhöhte Gefäßpermeabilität. So gelangt Plasmaflüssigkeit in den Interzellularraum und bildet ein Ödem (Enoch und Price, 2004). Die verbesserte Permeabilität bildet zudem die Voraussetzung für die Migration der Entzündungszellen ins Wundgebiet (Asmussen und Söllner, 1993). Durch den Endotheldefekt freigelegtes Kollagen aktiviert gleichzeitig die Thrombozyten, die die primäre Hämostase einleiten. Die Thrombozyten binden im Bereich des Gefäßdefektes, verhaken sich durch die Ausbildung von Pseudopodien, und bilden so einen primären Pfropf (reversible Plättchenaggregation). Dieser Prozess wird durch ADP (Adenosindiphosphat), Thromboxan A_2 und PAF (platelet activating factor) unterstützt, die ebenfalls durch die Thrombozyten ausgeschüttet werden. Der Pfropf bildet ein Netzwerk, in dem sich Erythrozyten und andere Zellen verfangen (Asmussen und Söllner, 1993). Nach seiner Abtrocknung entsteht eine Schorfkruste, die die Wunde vor Flüssigkeitsverlust und Infektion schützt (Monaco und Lawrence, 2003).

a. Heilung per primam



b. Heilung per secundam intentionem



I: Exsudative Phase: Aus eröffneten Gefäßen tritt Blut in die Wundlücke. Durch Gefäßkontraktion und Blutgerinnung sistiert der Blutaustritt. Es entsteht ein Gewebeödem mit Azidose (katabole Phase). Thrombozyten bilden Wachstumsfaktoren, wodurch Granulozyten und Gewebsmakrophagen angelockt werden. Beginn des Abbaus von Detritus.

II: Proliferative Phase: Einsprossen neuer Kapillaren, damit Beginn der anabolen Stoffwechsellaage. Fibroblasten bilden extrazelluläre Matrix. Myofibroblasten führen zur Wundkontraktion, die besonders bei der sekundären Wundheilung ausgeprägt ist.

III: Reparative Phase: Zunahme der mechanischen Stabilität durch Vernetzung und Ausrichtung von kollagenen Fasern. Die Wundoberfläche verschließt sich durch Epithelisation.

Abb. 1: Schematische Darstellung der drei Wundheilungsphasen und ihres zeitlichen Verlaufs bei primärer und sekundärer Wundheilung (Thiede und Debus, 2006)

Parallel dazu läuft die sekundäre Hämostase ab. Sie besteht aus einer extrinsischen und intrinsischen Aktivierungskaskade, die entweder durch die Bindung von Gewebethromboplastin (aus zerstörten Zellen) an Gerinnungsfaktor VII oder durch Aktivierung des Faktors XII durch negativ beladene Oberflächen (Kollagen) ausgelöst wird (Jelkmann, 2005). Sie endet immer in der Produktion von Thrombin, das die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Das entstehende Fibrin polymerisiert und bildet ein Netzwerk, das den Thrombozytenpfropf stabilisiert (Monaco und Lawrence, 2003). Durch aus den α -Granula freigesetztes Thrombospondin werden diese Fibrinbrücken verfestigt und die irreversible Aggregation eingeleitet (Jelkmann, 2005).

Das durch Antigene aktivierte Komplementsystem bzw. einige seiner Faktoren, TNF- α sowie TGF- β (transforming growth factor) und PDGF locken die ersten Entzündungszellen in das Wundgebiet (Monaco und Lawrence, 2003). Die neutrophilen Granulozyten gelangen durch Diapedese aus dem Gefäßsystem ins Gewebe und beginnen dort mit der Phagozytose von Bakterien, Fremdmaterial und degeneriertem Gewebe, dessen Abbau sie außerdem durch die Sekretion von Kollagenasen und Elastasen unterstützen. Auf diese Weise soll eine Wundinfektion verhindert oder minimiert werden.

In diesem Zusammenhang spielt Sauerstoff eine wichtige Rolle, der durch die Granulozyten für den oxidativen Burst verbraucht wird. Katalysiert durch eine NADPH-Oxidase entstehen im Innern des Granulozyten aus molekularem Sauerstoff reaktive Sauerstoffmetaboliten, die eine hohe Mikrobizidie aufweisen und phagozytierte Bakterien unschädlich machen. Für die halbmaximale Produktion dieser reaktiven Sauerstoffmetaboliten wird ein Sauerstoffpartialdruck von 45-80 mmHg, für die maximale Produktion > 300 mmHg benötigt (Allen et al., 1997), was allerdings nur bei Ventilation von reinem Sauerstoff möglich wäre. Die Neutrophilenfunktion wird unter hypoxischen Bedingungen stark beeinträchtigt und die Gefahr einer Wundinfektion steigt (Allen et al., 1997; Hopf et al., 1997).

Etwa 48-72 h nach der Verwundung treten, angelockt durch Komplementfaktoren, IgG Fragmente, Kollagenabbauprodukte, PDGF (platelet derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor) und Cytokine, sowie Monozyten hinzu, die sich

bei Eintritt ins Gewebe in Makrophagen wandeln und ebenfalls phagozytieren (Enoch und Price, 2004; Asmussen und Söllner, 1993). Auch sie unterstützen die Wundsäuberung durch proteolytische Enzyme und sezernieren zusätzlich wichtige Stoffe wie Interleukin und TNF (Tumornekrosefaktor) zur Unterstützung der Gefäßneubildung und Fibroblastenstimulation, sowie TGF zur Anlockung von Keratinozyten (Campos et al., 2008).

Proliferationsphase: Zwischen Tag 3 bis 5 nach der Wundsetzung beginnen verschiedene, zum Teil synchron verlaufende Proliferationsmechanismen. Sie setzen sich zusammen aus Angiogenese, Fibroplasie und Epithelisierung (Rytz, 2004). Der Übergang aus der Exsudationsphase setzt mit der Migration der Fibroblasten ein. Sie differenzieren sich aus mesenchymalen Zellen des umgebenden Bindegewebes und wandern dann entlang des Fibrinnetzes in die Wunde (Rytz, 2004). Sie synthetisieren Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Kollagen, Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix, und ersetzen so die auf Fibrin basierende provisorische Matrix mit kollagenreichem Granulationsgewebe (Campos et al., 2008).

Für die Kollagenproduktion benötigen die Fibroblasten Sauerstoff. Die Kollagenproduktion wird allerdings anfangs durch die mangelhafte metabolische Wundsituation mit niedrigem Sauerstoffgehalt, sinkendem pH-Wert und vor allem einer steigenden Laktatkonzentration – Abgabe durch die Leukozyten - initiiert (Hunt et al., 1978). Auch die Ausschüttung des stärksten angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) aus den Makrophagen wird durch die hohen Laktatgehalte stimuliert (LaVan und Hunt, 1990; Constant et al., 2000). Eine weiterhin bestehende hypoxische Grundsituation wirkt dann jedoch der Wundheilung entgegen.

Während der Kollagenproduktion sind verschiedene Ezymreaktionen direkt abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff. Das Enzym Prolylhydroxylase führt die Vorstufe Hydroxyprolin in Prolin über, was dann zur Tripelhelixbildung der Kollagen-Polypeptidketten beiträgt. Die einzelnen Kollagenketten der Tripelhelix werden dann durch die Lysylhydroxylase und Lysyloxidase weiter untereinander verbunden. Alle diese Vorgänge benötigen Sauerstoff (Prockop et al., 1963; Gordillo und Sen, 2003).

Kollagen als Matrixbestandteil ist eng mit den Vorgängen der Angiogenese verbunden. Die Gefäßneubildung wird durch den wichtigsten proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF aus den Makrophagen durch einige weitere wie PDGF, TGF- β , b-FGF (Tab. 1) und Faktoren wie Angiopoetin, Endothelin, Prostaglandin und Leukotriene unterstützt (Jeremy und Dashwood, 2006). Sauerstoffbehandlung des Gewebes steigert die VEGF - Gehalte in vivo in Wunden (Sheikh et al., 2000; Gordillo et al., 2008). Endothelzellen des umgebenden Gewebes bilden neue Sprossen, indem sie nach Sekretion von Enzymen aus dem endothelialen Verband durch die Basalmembran ausscheren und neue Gefäßstrecken bilden. Neben der „sprouting angiogenesis“, die obligat Endothelzellmitosen impliziert, werden weitere Endothelzellen aus interstitiellen EPCs (endothelial precursor cells) integriert. Die entstandenen Gefäßsprossen entwickeln sich weiter und vergrößern ihr Lumen, bis sie mit präexistenten Gefäßen oder weiteren Gefäßsprossen anastomisieren und so die Durchblutung wieder herstellen (Jeremy und Dashwood, 2006). Jedes Gefäßknäuel entspricht einem Körnchen des Granulationsgewebes (lat. Granula = Körnchen) und verleiht ihm sein typisch glasig-rotes Aussehen (Sedlarik, 1994). Mit zunehmender Neuvaskularisierung verbessert sich auch das Wundmilieu und die physiologische Sauerstoffspannung wird wiederhergestellt (Sedlarik, 1994).

FAKTOR	QUELLE	FUNKTION
EGF (Epidermal growth factor)	Thrombozyten	pleiotrope Zellmotilität und Proliferation
TGF α (transforming growth factor α)	Makrophagen, Epidermiszellen	pleiotrope Zellmotilität und Proliferation
bFGF (basic fibroblast growth factor)	Makrophagen, Endothelzellen	Angiogenese und Fibroblastenproliferation
KGF (keratinocyte growth factor)	Fibroblasten	epidermale Zellmotilität und Proliferation
TGF β (transforming growth factor β)	Makrophagen, Thrombozyten	epidermale Zellmotilität, Chemotaxis (Makrophagen, Fibroblasten), Synthese und Remodelling der extrazellulären Matrix
PDGF (platelet - derived growth factor)	Makrophagen, Thrombozyten, Epidermiszellen	Fibroblastenproliferation, Makrophagen- aktivierung und Chemotaxis (Fibroblasten, Makrophagen)
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Epidermalzellen, Makrophagen	Angiogenese, Steigerung der vaskulären Permeabilität
TNF α (tumor necrosis factor α)	Neutrophile	pleiotrope Expression von Wachstumsfaktoren

Tab. 1: Übersicht der wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Wundheilung (abgewandelt nach Singer und Clark, 1999)

Feuchtes Granulationsgewebe bildet die Grundlage zur Epithelisierung. Epithelzellen aus dem intakten Wundrand lösen ihre Verbindungen (Desmosomen) zu Nachbarzellen und Basalzelluntergrund und migrieren in das Wundzentrum. Mit Hilfe von Kollagenasen lösen sie die Basis der Wundkruste und wandern unter dem

Schorf. Sobald sie auf andere Epithelzellen treffen, wird ihre Wanderung durch Kontaktinhibition beendet (Rytz, 2004). Weitere Zellteilungen folgen bis alle Schichten des Epithels wieder aufgebaut sind. Die sich bildende Neoepidermis ist ähnlich der nativen, ist allerdings insgesamt dünner, hat eine flachere Basalmembran und ihr fehlt das Gefäßnetzwerk (Monaco und Lawrence, 2003). Verschiedene Wachstumsfaktoren spielen bei diesem Prozess der Epithelisierung eine wichtige Rolle: EGF (endothelial growth factor) stimuliert die Mitogenese und Chemotaxis, bFGF (basic fibroblast growth factor) und KGF (keratinocyte growth factor) aktiviert die epitheliale Proliferation (Enoch und Price, 2004).

Regenerationsphase: Der Prozess der Maturation beginnt nach ausreichender Produktion von Kollagen (17-21d) und kann Monate bis Jahre dauern (Rytz, 2004). Das zunächst gebildete Kollagen im Granulationsgewebe hat eine dünnere Struktur und ist parallel zur Wundoberfläche orientiert. Dieses Kollagen vom Typ III wird dann durch Fibroblasten durch das dickere Kollagen Typ I ersetzt und durch Querverbindungen verstärkt. Es wird entlang der Spannungslinien ausgerichtet und erhöht so die Zugfestigkeit des Gewebes (Campos et al., 2008). Das reife Narbengewebe verfügt dann über ein Kollagen Typ I/III Verhältnis von 8,5:1,5 (Böcker et al., 2001). Zusätzlich findet auch eine sogenannte Wundkontraktion statt. Dabei verwandeln sich Fibroblasten in spezialisierte Zellen, sogenannte Myofibroblasten, die Aktin als kontraktiles Element enthalten (Gabbiani et al., 1971). Myofibroblasten bilden über Desmosomen Zell-zu-Zellverbindungen aus (Montandon et al., 1977) und über ihre ebenfalls bestehende Verbindung zu den Wundrändern kontrahiert das gesamte granulierende Wundbett (Stadelmann et al., 1998). Die Wunde verkleinert sich. Kontinuierlich nimmt die proliferative Zellaktivität ab, Kapillaren bilden sich zurück und die Gewebefestigkeit nimmt zu. Es entsteht eine dichte, gefäßarme Narbe im Hautniveau. Nach 3 Wochen hat das neue Gewebe bereits etwa 30% seiner ursprünglichen Reißfestigkeit, nach 3 Monaten kommt es auf etwa 80%, erreicht aber gewebeabhängig nie wieder 100% (Sabiston, 1997).

1.3 Wundheilung und Alter

Mehrere Dekaden war die gängige Lehrmeinung, dass der Wundheilungsprozess im alternden Organismus verlangsamt oder sogar verschlechtert ist. Die ersten Dokumentationen über eine Beeinträchtigung der Wundheilung im Alter erfolgten Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts durch einen Militärarzt, der die Heilung offener Wunden über einen Vernarbungs-Index charakterisierte und diesen dann mit dem Alter korrelierte (Du Noüy, 1916). Ihr folgten verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen über Inzisionswunden mit dem Ergebnis, dass junge Tiere über eine bessere Wundkontraktion und kürzere Verschlusszeiten verfügen (Billingham und Russell, 1956; Cuthbertson, 1959).

Jüngere Arbeiten zeigen dagegen, dass eine schlechte Wundheilung im Alter per se nicht ausreichend bestätigt ist (Ashcroft et al., 1995). Fest steht, dass die komplexen Wundheilungsvorgänge im Alter Veränderungen unterliegen. Man kommt vermehrt zu dem Schluss, dass die abweichenden Wundheilungsprozesse im Alter in einer Verzögerung der Heilung resultieren, aber ohne die Qualität zu beeinträchtigen (Ashcroft und Horan, 1997; Gosain und DiPietro, 2004). Demgegenüber schlossen Brem und Tomic-Canic (2007) und Quirina und Viidik (1991), dass Verzögerungen der Wundheilung nur dann entstehen, wenn zu dem Faktor Alter noch eine Begleiterkrankung kommt.

Literaturrecherchen und Neuerscheinungen wie das Journal of Wound Repair and Regeneration zeigen, dass in den letzten zehn Jahren ein neues Problembewusstsein bezüglich der Optimierung von Wundheilungsprozessen aufgetreten ist. Durch den stetig steigenden Anteil alter Menschen in der Gesellschaft, sind die in dieser Bevölkerungsgruppe vermehrt auftretenden Wundheilungsstörungen, ausgelöst durch häufig auftretende Begleiterkrankungen oder durch nachlassende Heilungstendenz im Alter, zu einem wichtigen Kostenfaktor des Gesundheitssystems geworden (Gerngroß, 2001). Die enorme sozioökonomische Bedeutung von Wundheilungsstörungen in der Humanmedizin (Kostenschätzung: jährliche Gesamtbelastung durch chronische Wunden im deutschsprachigen Raum von über 2 Mrd. €) (Assadian et al., 2006), sowie die Verfügbarkeit von Wachstums- und

Angiogenesefaktoren haben zahlreiche neue Ansätze in der Forschung stimuliert (Kiritsy et al., 1993; Galiano et al., 2004). Neben den Entwicklungen in der molekularen Medizin haben aber auch eher einfache, bereits in den Hintergrund getretene Modalitäten, wie die Vitamin-C-Substitution (Rümelin et al., 2005) oder physikalische Maßnahmen (z. B. Magnetfeldtherapie, Elektrotherapie,...) eine Renaissance erlebt (Lee et al., 2007; Strauch et al., 2007). Eine dieser physikalischen Modalitäten ist die Behandlung mit Infrarotstrahlung. Da diese die Grundlage für die vorliegende Dissertationsschrift ist, sollen zunächst die Historie und physikalischen Grundlagen der IR-Strahlung (Infrarot-Strahlung) angesprochen werden.

1.4 Infrarotstrahlung: historischer Abriss

Der Musiker und Astronom Sir Friedrich Wilhelm Herschel (1738-1822) entdeckte 1800 durch einen Zufall die Infrarotstrahlung. Er wollte herausfinden, wie viel Wärme durch die verschiedenfarbigen Filter dringt, die er zur Beobachtung der Sonne benutzte. Dabei stellte er fest, dass verschiedene Farbfilter unterschiedliche Wärmeenergiemengen durchließen und folgerte daraus, dass schon die Farben an sich verschiedene Wärmemengen enthalten könnten. Herschel überprüfte seine Hypothese mit einem Versuchsaufbau: Er ließ Sonnenlicht durch ein Glasprisma fallen, um es in seine spektralen Anteile zu zerlegen. Mit verschiedenen, an den Enden geschwärzten Thermometern, was die Wärmeabsorption verbessern sollte, maß er dann die Temperatur jeder einzelnen Farbe und fand heraus, dass diese vom violetten zum roten Teil des Spektrums hin zunahm. Zwei Thermometer platzierte er an beiden Seiten des Spektrums zur Kontrolle. Dabei stellte er fest, dass die Temperatur direkt außerhalb des roten Bereiches am höchsten war. Diese nicht-sichtbare Form von Licht nannte er „kalorische“ Strahlung und wird heute als Infrarotstrahlung bezeichnet (DSI Deutsches Sofia Institut, 2009).

Die Infrarotstrahlung wird historisch-messtechnisch begründet in drei Bereiche differenziert. Man unterscheidet den IR-A Anteil, der die Wellenlängen von 760-1400

nm umfasst, IR-B von 1400-3000 nm und IR-C von 3000-10000 nm (Cobarg, 1995). Sie gehorcht im Wesentlichen den Gesetzen der Optik, was bedeutet, dass sie am biologischen Gewebe der Absorption, Reflektion und Streuung unterliegt. Die verschiedenen Strahlungsanteile verhalten sich dabei höchst unterschiedlich (Hellige et al., 1995).

Die Absorption findet unter Anregung von H₂O-Molekülen statt und nimmt mit steigender Wellenlänge zu (Hellige et al., 1995). Spezifische Absorptionsmaxima bzw. Wasserabsorptionsbanden sind bei $\lambda = 940$ nm, 1130 nm und 1380 nm nachweisbar (Cobarg, 1995). Die Transmission hingegen verhält sich reziprok und hat im kurzwelligen Bereich ihr Maximum. Dies bedeutet für die klinische Anwendung eine höhere Tiefenwirkung des IR-A bei geringer thermischer Oberflächenbelastung. Im Gegensatz dazu hat das IR-B und IR-C einen geringen Tiefeneffekt bei hoher thermischer Belastung der Grenzfläche (Hellige et al., 1995).

Die Reflexion ist ebenfalls wellenlängenabhängig: innerhalb des IR-A Bereiches sinkt sie mit steigender Wellenlänge von 80% auf 10% und beträgt im IR-B und IR-C Bereich nur noch wenige Prozent (Hellige et al., 1995).

Der Hauptanteil des kurzwelligen IR-A wird zu 48% vom Corium bzw. zu 17% durch die Subcutis absorbiert und dringt dabei bis zu einer Tiefe von 25 mm ein. Die IR-B und IR-C Strahlung hingegen wird zum größten Teil durch die oberen Hautschichten aufgenommen und trägt dadurch maßgeblich zu schmerzhaften Überhitzungserscheinungen an der Hautoberfläche bei (Abb. 2) (Cobarg, 1995).

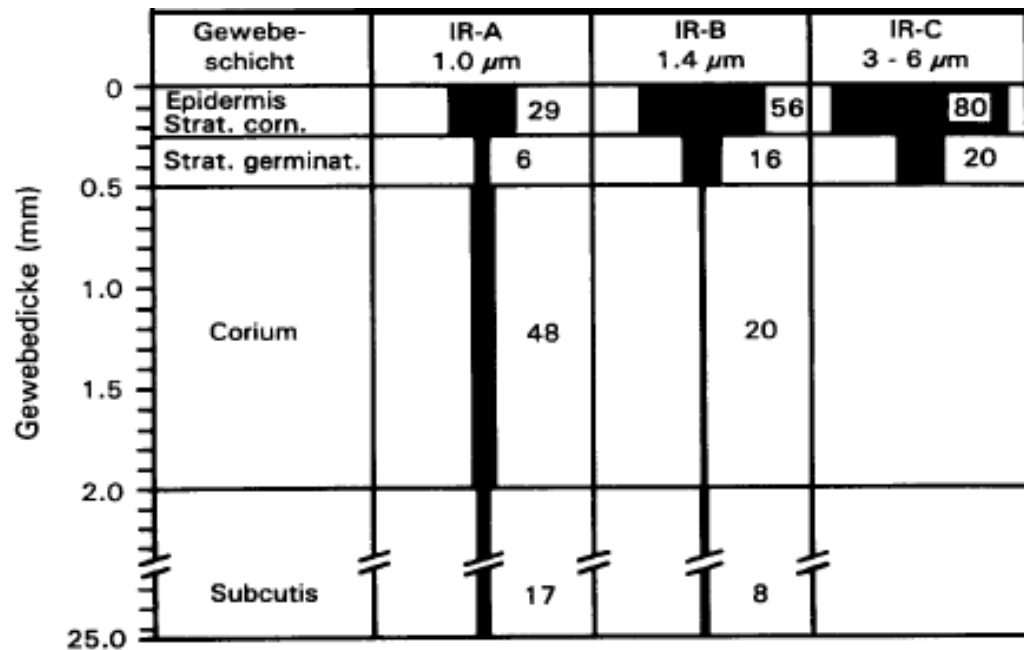


Abb. 2: Absorption von Infrarotstrahlung verschiedener Wellenlängen in den Gewebeschichten der menschlichen Haut, dargestellt in Prozent der gesamten absorbierten Strahlung der angegebenen Wellenlänge (Bachern und Reed, 1931). Strat. corn. = Stratum corneum, Strat. germinat. = Stratum germinativum, μm = Mikrometer, mm = Millimeter, IR-A/B/C = Infrarot-A/B/C

Der weitere Verlauf der Strahlung nach der Grenzfläche hängt nun stark vom Medium ab. Aufgrund der ausgeprägten optischen Inhomogenität biologischer Gewebe kommt es zu Streuungen. Treffen sie auf ein optisch dichteres Medium, wird ein Teil der Strahlung reflektiert und der hindurchtretende Reststrahl wird zum Flächenlot hin gebrochen (Rzeznik, 1995). Die optische Dichte ändert sich in einem Organismus durch die Zusammensetzung der physikalischen Medien als miteinander verbundene Gewebeschichten allerdings meist nicht sprunghaft, sondern nur allmählich. Das bedeutet, dass die Strahlung dann gebeugt in Richtung des Mediums mit höherer optischer Dichte verläuft (Rzeznik, 1995). Die zahlreichen Richtungsänderungen im Gewebe sind der Grund dafür, dass schon in den oberflächennahen Schichten starke Streuungen auftreten. Von dort aus verlaufen die Strahlen weiter diffus in die Tiefe, wo sie an absorptionsfähige Gewebebestandteile abgegeben werden (Rzeznik, 1995).

Die weitere Ausbreitung der Wärme findet durch konduktiven oder konvektiven Transport statt (Rzeznik, 1995). Durch Brown'sche Molekularbewegung wird ein

Wärmeenergiefluss von den Bereichen hoher Temperatur zu den Bereichen mit niedrigerer Temperatur ausgelöst (Hellige et al., 1995). Der konvektive Transport findet durch den Blutfluss statt, wobei der basale Blutfluss, der für den physiologischen Abtransport der aus dem Stoffwechsel anfallenden Wärme eine wichtige Rolle spielt, durch Reizung der Thermosensoren reflektorisch gesteigert wird (Hellige et al., 1995). Der zu erwartende Temperaturgrenzwert ist dabei allerdings quantitativ kaum abschätzbar und wird von Faktoren wie die Absorptionsbereitschaft des Gewebes sowie die Bestrahlungsstärke verstärkt. Konvektion und Konduktion wirken hingegen vermindernd auf den Grenzwert (Rzeznik, 1995), was z. B. auch die Effektivität der Hyperthermie als therapeutische Modalität in der Behandlung tief sitzender Tumoren erheblich limitierte (Nielsen et al., 2001), da der konvektive Transport den Aufbau eines ausreichend hohen Temperaturgradienten beeinträchtigt.

1.4.1 Wasserfilterung

Aus spektrometrischen Messungen mit Hilfe von Satelliten und Ballons ist bekannt, dass sich die Sonneneinstrahlung auf Höhe des Meeresspiegels deutlich von der außerhalb der Atmosphäre unterscheidet (Abb. 3). Die auf der Erde ankommende Strahlung ist nicht nur schwächer, sondern ihr fehlen bestimmte spektrale Anteile völlig (Cobarg, 1995). Für diese Filterung ist hauptsächlich der Wasserdampf der Atmosphäre aber auch Sauerstoff, Ozon und Kohlendioxid verantwortlich (Cobarg, 1995). Sie ist der Grund dafür, dass wir in gemäßigten Breiten die Sonneneinstrahlung als angenehm empfinden, in der Wüste mit geringer Luftfeuchtigkeit hingegen als „stechend“ beschreiben. Durch die Wasserfilterung werden diese Bereiche herausgefiltert, die sonst durch die Wassermoleküle der oberen Hautschichten absorbiert würden und dort zu übermäßiger thermischer Belastung und Schmerzempfindungen führen (Cobarg, 1995).

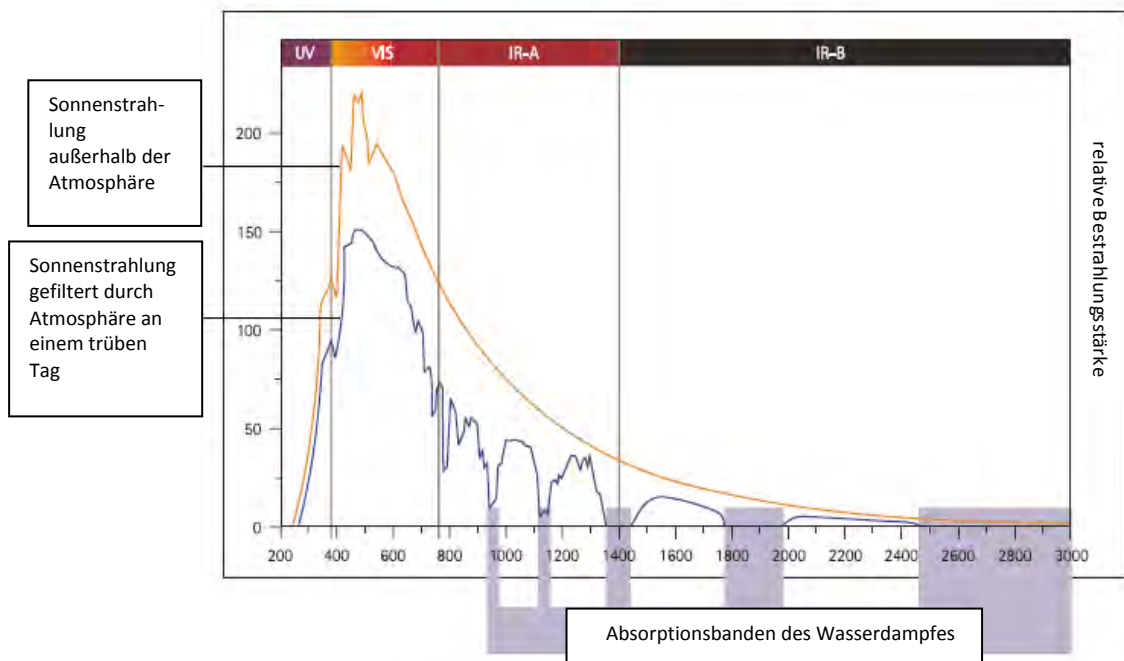


Abb. 3: Spektrum der Sonne oberhalb der Atmosphäre und nach der Filterung durch die Atmosphäre. Man erkennt deutlich die Absorptionsbanden des Wassers (Hydrosun, 2001). UV = Ultraviolett, VIS = visible light, IR-A/B = Infrarot-A/B

Rotlichtlampen, die für konventionelle Infrarotbehandlungen verwendet werden, enthalten diese spektralen Anteile immer noch und können beim Patienten zu schmerzhaften Überhitzungserscheinungen führen. Dies resultiert in einem Abrücken von der Lampe, was den Tiefeneffekt weiter vermindert (Cobarg, 1995).

Leitet man hingegen die Infrarotstrahlung eines Halogenstrahlers durch eine wassergefüllte Küvette, kann der filternde Effekt der Erdatmosphäre simuliert und die unerwünschten spektralen Anteile herausgefiltert werden. Dadurch wird die thermische Belastung der oberen Hautschichten signifikant verringert (Hellige et al., 1995). Abbildung 4 zeigt die Ähnlichkeit des verbleibenden Spektrums mit dem Sonnenspektrum in Meeresspiegelhöhe, vor allem im Bereich der Hauptabsorptionsbanden (Hydrosun, 2001).

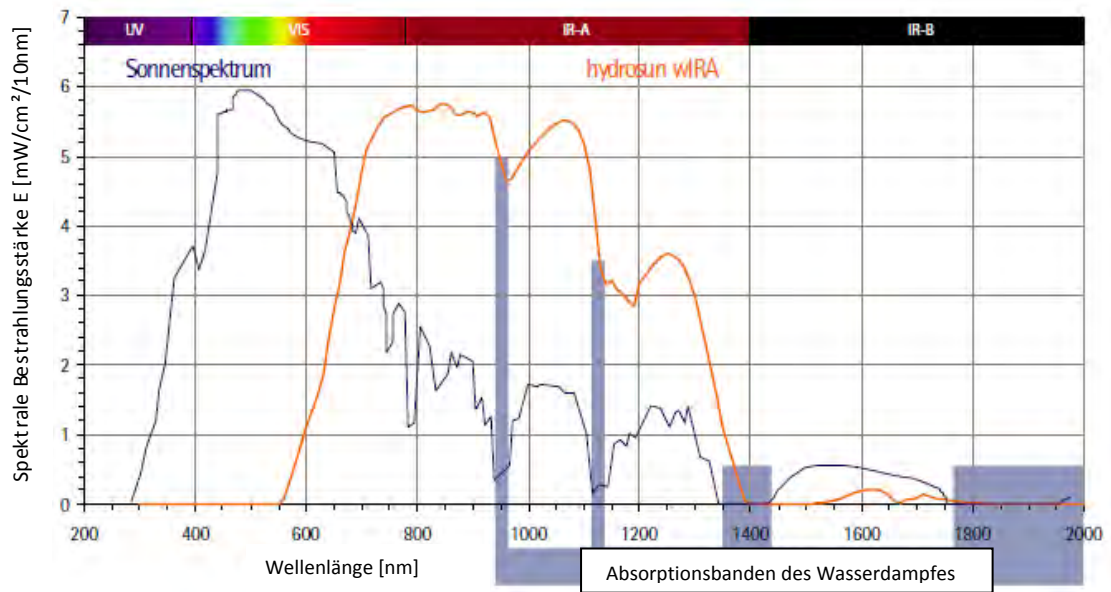


Abb. 4: Sonnenspektrum sowie das Spektrum des Hydrosun-Strahlers im direkten Vergleich. Auffällig sind die übereinstimmenden Wasserabsorptionsbanden (Hydrosun, 2001). UV = Ultraviolett, VIS = visible light, IR-A/B = Infrarot-A/B, nm = Nanometer, mW = Milliwatt, cm² = Quadratcentimeter, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

Das zurzeit einzige mobile IR-Kleingerät, das mit einer Wasserfilterung arbeitet, ist der Hydrosun-Strahler (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Deutschland), der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Die verbleibenden IR-A Anteile zeichnen sich durch eine hohe Gewebepenetration mit geringer thermischer Oberflächenbelastung aus. Hierdurch ist ein höherer Energieeintrag ins Gewebe möglich.

Ein weiterer Vorteil dieses Strahlers ist, dass im Gegensatz zur Sonne keine UV Strahlung emittiert und der Infrarotanteil mit Hilfe eines Farbfilters (BTE 595) gegenüber dem sichtbaren Licht (VIS = 380-780 nm) zusätzlich betont wird (Hoffmann, 2007).

1.4.2 Wirkmechanismen

Wassergefiltertes IR-A zeichnet sich durch eine hohe primäre Tiefenwirksamkeit aus. Durch die hohe Gewebepenetration der Infrarot-A-Strahlung (Cobarg, 1995) wird in der Tiefe des Gewebes ein therapeutisches Wärmefeld aufgebaut (Hellige et al., 1995; Vaupel und Stofft, 1995). Die daraus resultierende Durchblutungssteigerung (Hellige et al., 1995; Mercer, 2005) sorgt für die schnelle Bereitstellung von Nährstoffen und eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Gewebes; der Sauerstoffpartialdruck wird angehoben (Hartel et al., 2006). Durch den Temperaturanstieg erfolgt eine Stoffwechselsteigerung, die gemäß der RGT- Regel (3°C Temperaturerhöhung \rightarrow 30% Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit) die Energie liefernden Prozesse zusätzlich positiv beeinflusst (Hoffmann, 2006).

Neben diesen thermischen Effekten werden der wIRA zahlreiche nicht-thermische Effekte zugeschrieben, die auf der Reizsetzung auf Zellen oder zellulären Strukturen beruhen. Es kommt teilweise schon bei sehr geringen Bestrahlungsintensitäten zu zielgerichtetem Plasmodienwachstum (Albrecht-Buehler, 1991) oder gerichtetem Wachstum von Neuronen (Ehrlicher, 2002), zur Beeinflussung der Cytochrom-Oxidase-c (Karu, 1999; Karu et al., 2001) oder zu zellschützenden Effekten von Infrarot A (Menezes et al., 1998) oder wassergefiltertem Infrarot A gegen durch UV-Strahlung verursachte Schäden (Applegate et al., 2000). Bestimmte Wellenlängen innerhalb des wIRA beeinflussen die Adhäsion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (Karu et al., 2001), was eventuell auch einen positiven Effekt auf kosmetische Resultate bei der Wundheilung hat (Hartel et al., 2006).

1.4.3 Bisherige wIRA Erfahrungen bei der Wundheilung

Hartel et al. (2006) untersuchen in einer prospektiven, randomisierten, kontrollierten, Doppelblind - Studie bei 111 Patienten nach Abdominalchirurgie in der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg die Therapie akuter Wunden mit wIRA. Die Testgruppe wird zweimal täglich für 20 min mit wIRA+VIS

in einem Abstand von 25 cm bestrahlt und zeigt gegenüber der Kontrollgruppe (nur VIS) eine signifikante und relevante Schmerzminderung ($p = 0,001$) verbunden mit vermindertem Analgetikabedarf. Die Evaluation der Wunden wird mittels einer visuellen Analogskala vom Chirurgen und Patienten durchgeführt und ergibt bei der Evaluation durch den Chirurgen eine signifikant verbesserte Wundheilung der wIRA-Gruppe. Ebenso wird das kosmetische Ergebnis an Tag 6 nach der OP beurteilt und fällt signifikant positiv zu Gunsten der behandelten Gruppe aus. Zudem gibt es einen Trend zur niedrigeren Wundinfektionsrate bei der wIRA-Gruppe (3 von 46, ca. 7% vs. 7 von 48, ca. 15%) und kürzerem Krankenhausaufenthalt (9 d wIRA vs. 11 d Kontrolle, $p = 0,037$; Hartel et al., 2006).

Andere Studien beschreiben ebenfalls positive Effekte der wIRA-Bestrahlung auf die Heilung akuter und chronischer Wunden (z. B. Brandverletzungen, chronisch venöse Unterschenkelulzera), oder experimenteller oberflächlicher Wunden (von Felbert et al., 2007; Hartel et al., 2007; Mercer et al., 2008).

Im Bereich der Veterinärmedizin findet die wIRA-Strahlung bisher vor allem in der Physiotherapie bei Pferden unterstützend Anwendung. Die bis tief in die Muskulatur reichende Hyperthermie bereitet manuelle Anwendungen vor und intensiviert sie (DIPO, 2009). Erste Erfahrungsberichte aus der Kleintierklinik heben besonders die gute Akzeptanz bei Patienten hervor. Die Wärmebehandlung mit wIRA zeigt hier gute Effekte bei Hypothermie im Zusammenhang mit einem Schockgeschehen oder intra- und postoperativ. Bestrahlte Tiere wachen schneller auf und zeigen weniger postnarkotische Symptome. Bei der Behandlung von Tieren mit dem Katzenschnupfenkomplex kann eine deutliche Verbesserung des Allgemeinbefindens innerhalb von 24 Stunden festgestellt werden (Schabel, 2009). Im Bereich des Pferdesports wird auch Infrarot-C-Strahlung eingesetzt. Bei Tieren mit Rückenproblematiken können nach Bestrahlung in einem sogenannten Thermium kurzfristig hochgradige Verbesserungen in der klinischen Symptomatik erreicht werden. Positiv hervorzuheben sind außerdem ebenfalls die Verträglichkeit und Akzeptanz (Kalinowski, 2007).

1.5 Zielsetzung

Aus den oben geschilderten physikalischen Grundlagen und den Erkenntnissen, dass wIRA das Gewebemilieu bei relativ hohem Energieeintrag ohne thermische Belastung der Oberfläche signifikant verbessert, können positive Effekte auf die Wundheilung postuliert werden. Unstrittig ist, dass eine verbesserte Gewebedurchblutung, höhere Sauerstoffversorgung und besserer Abtransport von Metaboliten für die Wundheilung förderlich sind. Trotzdem finden sich in der Humanmedizin nur wenige und in der Veterinärmedizin unseres Wissens keine Arbeiten in peer-reviewed Journals, die die positiven Effekte unstrittig beweisen und über eine Struktur-Funktions-Korrelation die Angriffspunkte und Wirkmechanismen belegen.

Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Arbeit, die möglichen Effekte der wIRA-Strahlung in einem etablierten Maus-Defektwundenmodell zu erfassen. Die Hypothese war, dass die „Time to Closure“ der Defektwunden als Modell für chronische Wunden unter wIRA kürzer ist als unter Scheinbestrahlung. Die zweite Hypothese war, dass die Effekte bei sehr alten Tieren, unter der Annahme einer verzögerten Wundheilung, ausgeprägter sind.

Neben dem primären Endpunkt Time to Closure sollte die Funktionalität der Narbe bzw. des Ersatzgewebes durch biomechanische Zug-Dehnungsversuche untersucht werden. Weitere sekundäre Endpunkte wie Schichtdicke, Gefäßdicke und Kollagengehalt sollten eine Struktur-Funktions-Analyse ermöglichen und zu einem besseren Verständnis der wIRA-Wirkung beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden weibliche, etwa 24-32 g schwere Balb/c Mäuse (Substamm J) aus Weiterzuchten der Zentralen Versuchstiereinrichtung Mainz verwendet. Die Jungtiergruppe war drei Monate alt. Bei den Alttieren handelte es sich um ehemalige Zuchttiere, deren Alter zu Versuchsbeginn zwischen 20 und 21 Monaten lag. Die Tiere wurden paarweise in Makrolonkäfigen Typ 2 (265 mm x 205 mm x 140 mm, Ebeco GmbH, Castrop-Rauxel) unter konstanten Raumbedingungen (23°C, 56% Luftfeuchte, 12 h Tag – 12 h Nacht – Rhythmus) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (extrudiertes Alleinfuttermittel für Mäusezucht, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Postoperativ wurden statt Einstreu Einmalpapiertücher und sterile Gazekompressen verwendet, um einer Wundkontamination vorzubeugen. Am zweiten Tag post OP wurden die Tücher durch normale Einstreu ersetzt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland von 2006, unter der Tierversuchs-Genehmigungsnummer 177-07/051-45 des Landesuntersuchungsamtes Rheinland Pfalz durchgeführt.

2.2 Vorversuche zur Ermittlung der Bestrahlungsstärke

Zu Beginn wurde die Energieverteilung bei unterschiedlichen Bestrahlungsmaxima im Zentrum des Bestrahlungsfeldes mit Hilfe des Bestrahlungsmessgerätes (HBM-1, Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim) untersucht. Dabei wurde ausgehend vom Zentrum in 5 cm Abständen die Bestrahlungsstärke gemessen (Tab. 2).

Bestrahlungsstärke [mW/cm ²]				
Zentrum	5 cm	10 cm	15 cm	20 cm
190	190	100	30	13
126	126	74	29	17
75,5	75	73	54	27

Tab. 2: Bestrahlungsstärken ausgehend vom Zentrum des Bestrahlungsfeldes. mW = Milliwatt, cm = Zentimeter, cm² = Quadratzentimeter

Ausgehend von den humanmedizinischen Bestrahlungsversuchen wählten wir anfänglich eine Bestrahlungsstärke im Zentrum von 190 mW/cm². Eine Maus wurde mit Avertin (Tribromoethanol) narkotisiert, ein Rektalthermometer eingeführt und am Schwanz fixiert. Zusätzlich wurde bei dem Tier vor Beginn der Bestrahlung, sowie nach 5 minütiger Bestrahlung, die Hauttemperatur an der rasierten Rückenpartie sowohl per Sonde (Thermoelement Typ 2ABAc, Philips, Kassel) als auch mittels Infrarotthermografie gemessen. Wegen des extremen Anstieges der Körperinnentemperatur auf fast 45°C nach nur 5 Minuten, haben wir im Folgenden die Bestrahlungsintensität auf 100 mW/cm² herabgesetzt. Hierbei stieg die Rektaltemperatur nach 10 Minuten auf 41,3°C. Eine weitere Nebenwirkung der hochdosierten Bestrahlung waren Corneatrübungen, die durch den fehlenden Lidschluss der narkotisierten Tiere entstanden. Die prophylaktisch applizierte Bepanthen Augensalbe (Dexpanthenol, Bayer Vital, 51368 Leverkusen) konnte dies nicht verhindern.

Ein weiteres Versuchstier wurde mit einer Dosis von 75 mW/cm² für ebenfalls 10 min bestrahlt. Es kam hier zu einem tolerierbaren Anstieg der Körperkerntemperatur von 32,2°C auf 37,9°C (physiologische Körpertemperatur 35-39°C; Visser, 2006). Bei nicht narkotisierten Tieren, an denen die Versuche im Folgenden durchgeführt wurden, traten unter dieser Dosierung keine Corneatrübungen auf.

Wir untersuchten im Anschluss den genauen Temperaturverlauf von Rektaltemperatur und Hauttemperatur mittels Infrarotthermographie und Sonde, sowie die subkutane Temperatur zweier Tiere unter 10 minütiger Infrarotbestrahlung bei 75 mW/cm² bis 20 Minuten nach Beendigung der Bestrahlungseinheit (Abb. 5). Auch

hier zeigte sich ein moderater Körperkerntemperaturanstieg auf maximal 39,3°C, der sich nach Bestrahlungsende noch etwa eine Minute fortsetzt.

Die Hauttemperaturen mit einem Maximum bei 39,7°C waren ebenfalls tolerierbar. Die subkutane Temperatur lag immer etwa 0,5-1°C unter der Hauttemperatur und sank nach Ende der Bestrahlung parallel zu ihr in etwa 15 Minuten wieder auf ihr Ausgangsniveau.

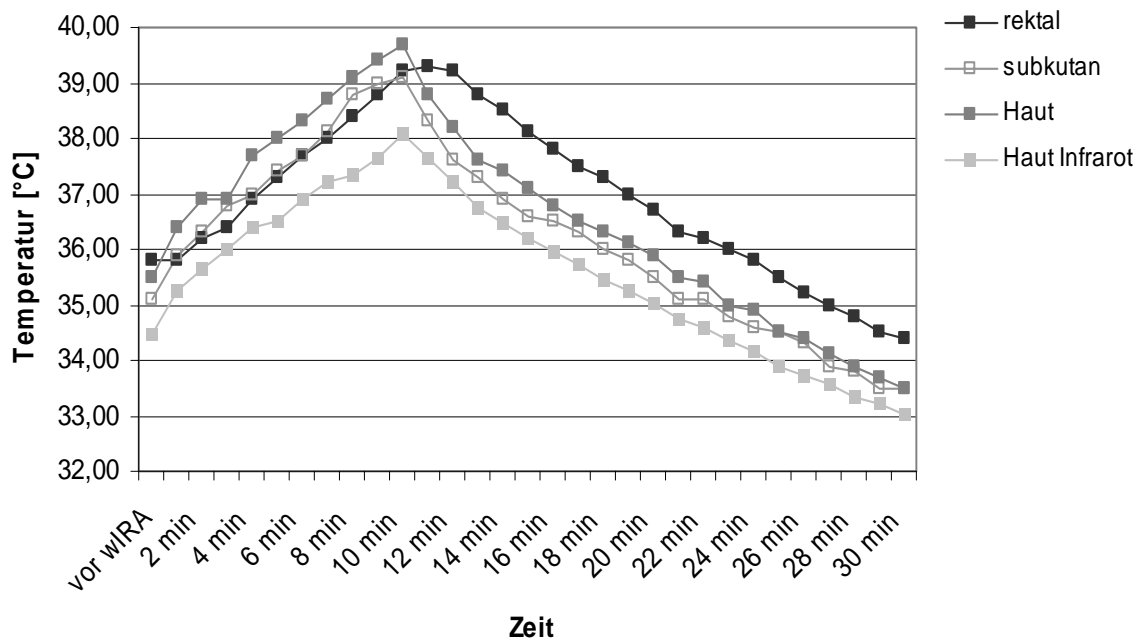


Abb. 5: Temperaturverlauf unter 10minütiger wIRA Bestrahlung (75 mW/cm²) bis 20 min nach der Bestrahlung. °C = Grad Celsius, min = Minute, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

2.3 Versuchsprotokoll

Junge Tiere: die Mäuse wurden gleichmäßig nach Gewicht in zwei Gruppen eingeteilt. Die Testgruppe (n=12) erhielt zweimal täglich im Abstand von sechs Stunden eine zehnminütige Bestrahlung mit wassergefilterter Infrarot A Strahlung bei einer Bestrahlungsstärke von 75 mW/cm². Die Kontrollgruppe (n=12) wurde unter identischen Bedingungen zweimal täglich scheinbestrahlt. Die Wunden aller Tiere wurden jeweils drei Tage nach Wundverschluss exzidiert (Abb. 6 a).

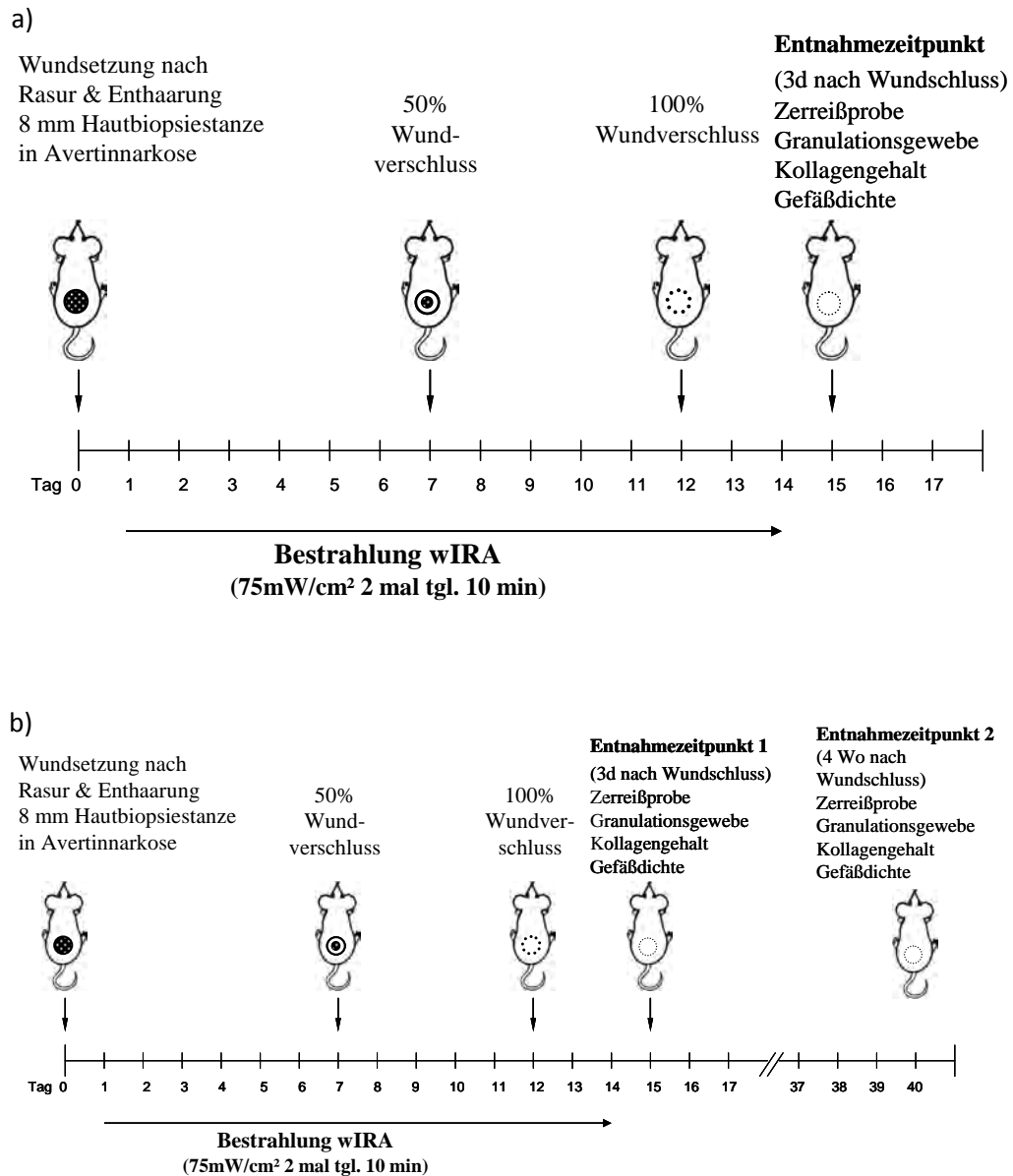


Abb. 6 a und b: Schematische Übersicht des Versuchsablaufs (junge Tiere a, alte Tiere b): Am Tag 0 erfolgte die operative Wundsetzung unter Narkose. Die erste Bestrahlung fand am Tag 1 mit einem Abstand von 56 cm für die Dauer von 10 min bei 75mW/cm² statt. Die Strahlungsdosis pro Bestrahlungseinheit betrug 45 J/cm². Ab Tag 2 wurde diese Behandlung zweimal täglich im Abstand von 6 h durchgeführt. Am Tag 9 erfolgte ein Schorfdébridement. Ab Tag 15 (3 d nach Wundverschluss) fanden die ersten Probenentnahmen der Tiere statt. Bei einem Teil der alten Tiere fand die Probenentnahme 4 Wochen nach Wundverschluss statt. Es erfolgte die Fotodokumentation der Wundrückseite, Zug-Dehnungs-Zerreißprobe und Vorbereitung der Proben zur Paraffineinbettung bzw. Immunhistochemie. mW = Milliwatt, cm² = Quadratcentimeter, d = Tag, Wo = Woche, mm = Millimeter, tgl. = täglich, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

Alte Tiere: die Mäuse wurden gleichmäßig nach Alter und Gewicht in zwei Gruppen eingeteilt. Die Testgruppe (n=17) und Kontrollgruppe (n = 17) wurden nach dem gleichen Schema wie die jungen Tiere behandelt bzw. scheinbestrahlt. Jeweils sieben Test- und Kontrolltiere wurden zu einem frühen Zeitpunkt (drei Tage nach Wundschluss), 10 Test- und Kontrolltiere zu einem späten Zeitpunkt (vier Wochen nach Wundschluss) entnommen (Abb. 6 b).

2.4 Operation und Narkose

Allen Tieren wurde am Vortag der OP die obere Rückenpartie bis in den Kreuzbereich trocken rasiert und anschließend mit elca® med Enthaarungscreme (Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland) gründlich enthaart. Die Wundsetzungen erfolgten nach Wägung in tiefer Avertin-Narkose (Dosierung; 1 ml/100 g KG). Hierzu wurden 1g Tribromoethanol mit 0,5g Pentanol in 6 ml 99%igem Ethanol gelöst und anschließend 67,5 ml 10 mM PBS Puffer dazugegeben, was 75 ml Avertin-Lösung ergibt. Um Corneatrübungen vorzubeugen, wurde jedem Tier Bepanthen Augensalbe (Dexpenthenol, Bayer Vital, 51368 Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Die Haut im Operationsgebiet wurde mit Ethanol (Frecaderm®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) desinfiziert. Unter dem OP-Mikroskop wurde über der Mittellinie des Rückens im Lendenwirbelbereich eine 8 mm große Vollhautzirkulärwunde gestanzt (Biopsiestanze 8 mm; Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, Deutschland) bzw. mit einer Schere geschnitten. Die allgemeine Körperfazie sollte hierbei intakt bleiben. Anschließend erfolgte die erste Fotodokumentation der Wundsituation. Die Mäuse wurden dann paarweise in Käfigen untergebracht und mit einer Wärmelampe bestrahlt, um eine narkosebedingte Unterkühlung zu vermeiden. Bis zum Abklingen der Narkose standen sie unter regelmäßiger Beobachtung und Aufwachkontrolle.

2.5 Bestrahlungsprozedere

Am Tag 1 nach der Wundsetzung fand die erste Bestrahlung der Testtiere von 10 min unter 75 mW/cm² wassergefiltertem Infrarot A statt. Die Kontrolltiere wurden für den gleichen Zeitraum ohne Bestrahlung unter den Hydrosun-Strahler gesetzt. Ab Tag 2 wurde die Bestrahlung bzw. Pseudobestrahlung zweimal täglich im Abstand von sechs Stunden durchgeführt. Am Tag 14 fanden die letzten beiden Bestrahlungseinheiten statt.

2.5.1 Bestrahlungsgerät

Für diese Untersuchungen wurde ein Hydrosun-Strahler (Hersteller: Hydrosun Medizintechnik GmbH, Mauchenerstr. 14, 79379 Müllheim) vom Modell wIRA 750 FS verwendet (Seriennummer 0870051). Dieses Gerät ist als aktives Medizinprodukt, Klasse IIa klassifiziert. In seinem zylindrischen Gehäuse, das außen mit Kühlrippen versehen ist, befindet sich eine Halogenlampe (USHIO HPL 575/230X+) als Strahlungsquelle (Abb. 7). Die Vorderseite schließt mit der Filterkuvette aus 4 mm Wasser und einem Standardfarbfilter BTE 595 zwischen Vorderfenster und dem hitzebeständigen Glaskeramikfenster als Rückseite ab. Dahinter befindet sich ein Parabolreflektor, der die Halogenlampe umschließt. Dieser garantiert eine einheitliche Strahlenbündelung für eine sich im Brennpunkt befindliche Punktlichtquelle. Daher hat der Reflektor eine genarbte Oberflächenstruktur, um durch Vielfachreflektion der Strahlen eine homogene Ausleuchtung zu erreichen und damit auch eine ausgeglichene Intensität und Erwärmung. Der Ventilator an der Strahlerrückseite saugt die Wärme aus Gehäuse, Kühlrippen und um den Küvettenkranz ab und leitet sie nach außen. Über eine elektrische Zeitschaltuhr lässt sich die Bestrahlungszeit regeln. Der Strahler emittiert ein Spektrum von 595-780 nm VIS (sichtbares Licht) und 780-1400 nm wIRA (wassergefiltertes Infrarot A).

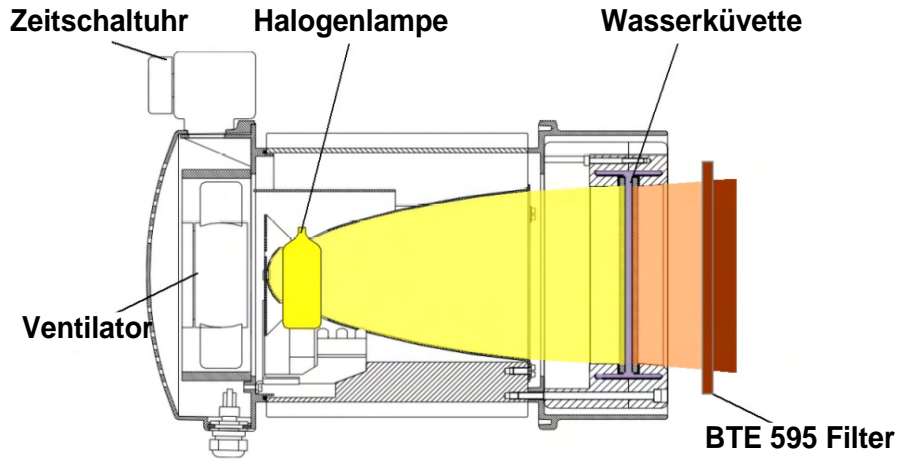


Abb. 7: Querschnitt eines wassergefilterten Infrarot-A Strahlers (Hydrosun, Müllheim, Deutschland). Die gesamte Strahlung einer Halogenlampe wird durch eine mit Wasser gefüllte Küvette geschickt, die unerwünschte Wellenlängen innerhalb des Infrarots (Infrarot B und C sowie die Wasserabsorptionsbanden innerhalb des Infrarot A) herausfiltert. Das Wasser ist innerhalb der Küvette hermetisch abgeschlossen. Der Ventilator sorgt für die Kühlung der Küvette und verhindert das Kochen des Wassers (abgewandelt nach Hydrosun, 2001).

2.5.2 Gerät zur Messung der Bestrahlungsstärken

Das Bestrahlungsmessgerät (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Deutschland) ist vom Typ HBM-1 (Seriennummer 0999901) und misst Strahlungsstärken von 10 bis maximal 1000 mW/cm². Eintreffende Photonen geben ihre Energie in Form von Wärme an den Detektor, eine Halbleiter-Thermosäule ab, an der dann eine Spannung entsteht, die proportional zur eingestrahnten Energie ist. Diese wird durch einen Spannungsmesser ermittelt, umgewandelt und auf dem Display als mW/cm² ausgegeben. Ein neutraler Dämpfungsfilter schützt den Detektor vor zu hohen Bestrahlungsstärken.

2.6 Dokumentationen

Bei allen Tieren wurden die Wundgrößen regelmäßig photographisch und die Temperaturabstrahlungen infrarotthermographisch dokumentiert.

2.6.1 Erfassung der aktuellen Wundgrößen

Die Wunden wurden mit einer JVC-Videokamera (3CCD, KY-F75U, Victor Company of Japan, Japan) auf einem Leica-Stativ mit einem Abstand von 30 cm und einer Vergrößerung von 1,6-fach kalibriert aufgenommen. Bei jeder Aufnahme wurde ein 5 mm langer Messbalken, der neben der Wunde platziert wurde, für ggf. notwendige Nachkalibrierungen mit aufgenommen. Die Aufnahmen wurden in ein Diskus-Morphometrie-System eingespeichert (Diskus 4.80, Hilgers, Königswinter; Deutschland). Die Größen der Wunden wurden interaktiv durch Markierung der Wundflächen mit einem Cursor erfasst.

2.6.2 Infrarotthermographie (IRT)

Zur Erfassung möglicher Effekte der Bestrahlung wurden alle Tiere jeden zweiten Tag (gerade Tage) 4 h nach der morgendlichen Behandlung thermographiert. Eine Untergruppe von vier Tieren (junge: B-WI-06, B-WI-07, B-WI-08, B-WI-09; alte: B-WI-30, B-WI-31, B-WI-40, B-WI-41) wurde zur Erfassung der Länge und des Ausmaßes der bestrahlungsbedingten Temperaturveränderung am ersten postoperativen Tag sequentiell zu folgenden Zeitpunkten untersucht:

Unmittelbar vor Bestrahlung (Leerwert)

Unmittelbar nach Bestrahlungsende

15 min nach Bestrahlungsende

30 min nach Bestrahlungsende
45 min nach Bestrahlungsende
60 min nach Bestrahlungsende
90 min nach Bestrahlungsende
2 Stunden nach Bestrahlungsende
3 Stunden nach Bestrahlungsende
4 Stunden nach Bestrahlungsende

Nachdem sich in einer ersten Zwischenauswertung zeigte, dass die Effekte der Bestrahlung von eher kurzer Dauer sind, wurden diese Untergruppen ab dem zweiten Tag nur unmittelbar vor und nach der Behandlung, sowie vier Stunden nach Bestrahlung thermographiert.

2.6.2.1 Infrarotkamera

Die Infrarot-Thermographien wurden mit dem Thermographiesystem Varioscan high resolution Typ 3021-ST durchgeführt (JENOPTIK, Laser, Optik Systeme GmbH; Seriennummer 133105; Abb.8). Der Temperaturmessbereich der Kamera liegt zwischen -40 bis 1200°C. Sie wurde ab Werk bei 22°C +/- 2°C normkalibriert und besitzt eine Temperaturmessgenauigkeit von < +/- 2K (bei einem Messbereichsendwert von 100°C, sonst < +/- 1% des jeweiligen Messbereichsendwertes). Dieses System ist mit einer Germaniumoptik für den Wellenlängenbereich von 8-12 µm ausgestattet. Das Objekt wird mittels eines zweidimensionalen Spiegelscanners abgetastet, wobei der Horizontalscanner die zeilenweise Abtastung vornimmt und der Vertikalscanner dann aus den einzelnen Zeilen ein Bild aufbaut. Das Bildformat beträgt 360 x 240 Pixel. Die Bildinformation gelangt vom Scanner durch die asphärische Abbildungsoptik auf den Stirling-gekühlten Detektor. Durch Fokussierung wird die Abbildungsoptik axial verschoben (Brennweite der Optik 35 mm). Die mögliche Objektentfernung liegt dabei zwischen 0,2 m und unendlich. Wir wählten eine Objektentfernung von 21 cm, was in einer 1,4-fachen Vergrößerung resultierte. Nach jedem

aufgenommenem Bild misst ein Thermoelement die Temperatur eines in den Strahlengang gebrachten Referenzstrahls (Chopper). Durch den Vergleich der Strahlungsintensität des Choppers und des Objekts wird eine Online-Temperaturmessung möglich. Die Steuerung der Kamera erfolgte mit der IRBIS ® control 2.2 Software (InfraTec GmbH, Dresden, Deutschland). Über ein PC-Link-Interface wurden durch ein Ethernetkabel und eine PC-Netzwerkkarte die Daten zu einem Notebook übertragen.



Abb. 8: Infrarotkamera Varioscan high resolution (Betriebsanleitung Varioscan high resolution, JENOPTIK, Jena).

2.6.2.2 IRT-Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der IRBIS ® professional 2.2 Software (InfraTec GmbH, Dresden, Deutschland). Prinzipiell ist es mit dieser Software möglich, eine beliebige Anzahl an Messdefinitionen (Messpunkte, -linien, -flächen) in das Thermografiebild zu setzen und die Temperaturen zu ermitteln.

Wir definierten über der Wunde eine Region of Interest, aus deren Temperaturhäufigkeitswerten der Mittelwert berechnet wurde (Abb. 9). Als Referenzwert wurden die Temperaturen in einem normalen Hautgebiet erfasst.

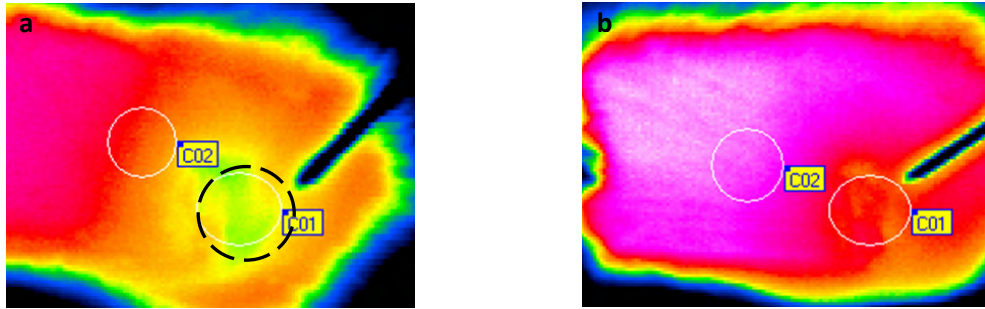


Abb. 9: Infrarot-Thermographien von Mäusen vor (a) und nach (b) der Bestrahlung. Das schwarz markierte Feld (a) entspricht der Wundfläche. C01 zeigt die Region of Interest über der Wunde, C02 den Referenzbereich über gesunder Haut.

2.7 Gewebeentnahme

Nach Euthanasie durch intraperitoneale Applikation von 0,2 ml Pentobarbital (Narcoren®, Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland) folgte vereinzelt eine Nachrasur des Wundareals mit dem Elektrorasierer. Unter dem OP-Mikroskop wurde ein quadratisches Hautstück um das Wundgebiet markiert. Dieses wurde exzidiert und mittels der vorher gemessenen Kantenlängen in seiner Originalgröße auf eine Korkplatte gepinnt, um eine Geweberetraktion infolge Muskelkontraktion zu verhindern. Anschließend erfolgte die Fotodokumentation der Wundrückseite mit ihrer Gefäßstruktur. Sie wurde unter dem Operationsmikroskop bei 2,5-facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 990, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) vorgenommen. Aus der Mitte der Wunde wurde dann eine 3 mm x 10 mm große Probe für den Zerreißtest ausgestanzt und ihre Seiten mit dem Skalpell hantelförmig verlängert. Diese Prüfkörper erhielten eine Hantelform (Abb. 10), damit die Zerreißung im schmäleren Bereich im Sinne einer „Soll-Bruch-Stelle“ erfolgte. Die Wundkanten, die sich kranial und kaudal der Stanze befanden, wurden zum einen in 4%igem Formalin (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und später für histologische Auswertungen in Paraffin (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) eingebettet, zum anderen in Alkohol für immunhistochemische Auswertungen fixiert.

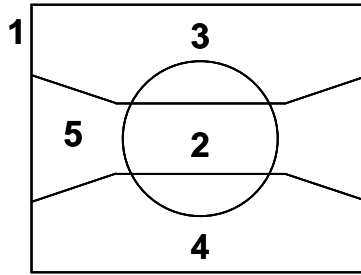


Abb. 10: Schematische Darstellung der Probenentnahme:

1. Hautausschnitt 2. Wunde 3. Restwundbereich zur Formalinfixierung
4. Restwundbereich zur Alkoholfixierung 5. hantelförmige Stanze für Zug-Dehnungs-Zerreißprobe.

2.8 Zug-Dehnungs-Zerreitest

Die hantelförmigen Enden des ausgestanzten Gewebestreifens wurden in den Klemmbacken eines Tensiometers (Wolloscheck et al., 2004; Abb. 11) fixiert, die anschließend durch einen Elektromotor mit der Geschwindigkeit von 0,65 mm/s bis zur Zerreißung der Probe auseinander getrieben wurden. Die dabei aufgewendeten Kräfte wurden über einen Kraftaufnehmer ermittelt und als Weg-Kraft-Diagramm in der Catman 4.5 Software (HBM, Hottinger Baldwin Messtechnik, Langen, Deutschland) auf dem PC dargestellt. Zur weiteren Auswertung wurde F_{\max} (maximale Kraft zur Zerreißung der Probe) verwendet.

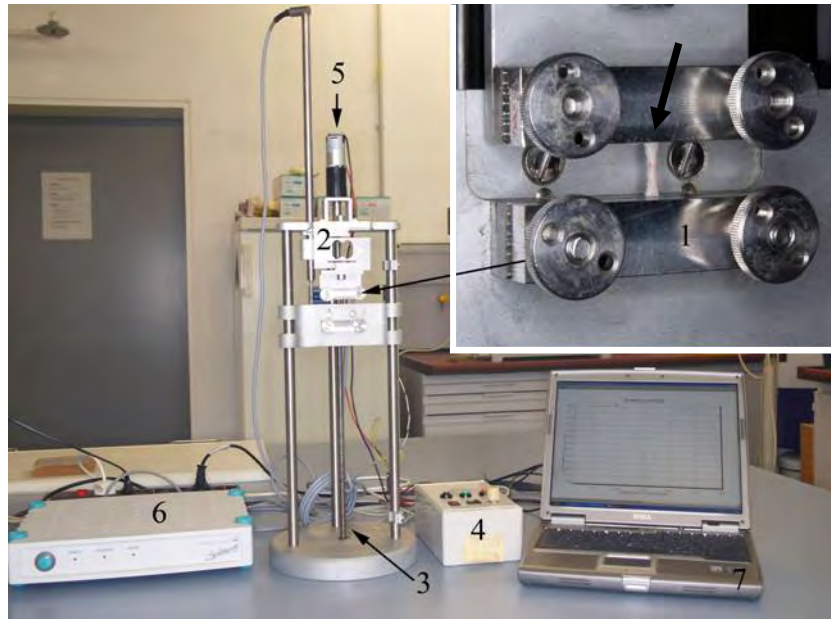


Abb. 11: Versuchsaufbau Zug-Dehnungs-Zerreitest:
 1. Klemmbacken mit eingespannter Gewebeprobe (→) 2. Kraftaufnehmer 3.
 Spindel 4. Potentiometer 5. Elektromotor 6. Verstärker (Spider 8) 7. PC (Catman
 4.5 Software).

2.9 Histologische Verfahren

Die kranialen Abschnitte der Wunde wurden als Proben für die Formalinfixierung, die kaudalen Abschnitte zur Alkoholfixierung gewonnen.

Die einzelnen Schritte der Alkoholfixierung waren:

1 x 50% Isopropylalkohol (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) 20 min

1 x 70% Isopropylalkohol 20 min

1 x 90% Isopropylalkohol 20 min

2 x 100% Isopropylalkohol je 20 min

2 x Xylol (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) je 20 min

Die restlichen Proben wurden über Nacht in 4 %igem Formalin fixiert und anschließend im Einbettautomaten Shandon Excelsior (Hypercenter 2 Shandon, Frankfurt a. M., Deutschland) in folgenden Schritten dehydriert:

2 x 4% Formalin je 10 min

1 x 70% Isopropylalkohol 30 min

1 x 80% Isopropylalkohol 30 min

1 x 90% Isopropylalkohol 30 min

1 x 96% Isopropylalkohol 30 min

2 x 100% Isopropylalkohol je 30 min

1 x Xylol 20 min

2 x Xylol je 30 min

Anschließend wurden die Proben in Paraffin (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) eingebettet und in Formen ausgegossen. Nach der Aushärtung wurden am Schlittenmikrotom (Schlittenmikrotom Leica, Jung SM 2000R, Nussloch, Deutschland) Schnitte von 5 µm Dicke hergestellt, die nach Streckung im 37°C warmen Wasserbad auf einen Objektträger (Super-Frost® Plus Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen wurden.

2.10 Lichtmikroskopie

Die Haematoxilin-Eosin (Haemalaun sigma MHS-32, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)-Färbung der Paraffinschnitte erfolgte nach Standardprotokoll (s. Anhang). Von den Schnitten wurden mit dem Photomikroskop Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitale Aufnahmen angefertigt, die dann mittels des Analyseprogramms Diskus ver. 4.80 (Hilgers, Königswinter; Deutschland) an einem 20 Zoll Flachbildschirm ausgewertet wurden.

2.10.1 Schichtdicken

Um die durchschnittlichen Schichtdicken von Granulationsgewebe, Epidermis und Dermis, Subkutis und des Hautmuskels zu ermitteln, wurden jeweils 5 Strecken in jeder der Schichten senkrecht zur Oberfläche gemessen und der Mittelwert gebildet (Abb. 12). Zur Durchführung der Messung wurden die Präparate der jungen Tiere und die der alten Tiere früher Entnahme in 5- oder 10-facher Objektivvergrößerung und 160-facher Endvergrößerung auf dem Bildschirm dargestellt.



Abb. 12: Beispiel für eine Schichtdickenmessung der einzelnen Gewebearten. Färbung: HE
Objektivvergrößerung: 5x; Endvergrößerung 70x; schwarzer Balken = 500µm.
Die angezeigten Werte werden für die Berechnung in ein
Tabellenkalkulationsprogramm importiert. µm = Mikrometer

2.10.2 Kollagenfaseranteil

Die Präparate wurden nach Standardprotokoll mit Pikrin-Sirius-Rot gefärbt (s. Anhang). Anhand der Pikrin-Sirius-Rot gefärbten Schnitte wurde der Kollagenfaseranteil ermittelt.

Zunächst wurden von jedem Präparat mit dem Photomikroskop Axiophot digitale Aufnahmen des Wundgebietes angefertigt. Danach wurden die kollagenhaltigen Anteile mit Hilfe der Software KS 300 (Kontron AG, Eching Deutschland) farbcodiert. Mittels Falschfarbenanalyse wurde dann der prozentuale Anteil kollagener Fasern an der Region of Interest erfasst. Von jedem Präparat wurden drei Messwerte ermittelt und ein Mittelwert gebildet.

2.10.3 Gefäßdichtebestimmung

Für die immunhistologische Untersuchung wurde vom alkoholfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe am Schlittenmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Um die Endothelzellen immunhistologisch darzustellen, wurde ein gegen CD 31 gerichteter Antikörper verwendet der ein Glykoprotein markiert, das auf adulten und embryonalen Endothelzellen, sowie schwach auf Thrombozyten exprimiert wird.

Mittels des Photomikroskopes Axiophot wurde jeweils eine Aufnahme des Wundbereiches und intakter Haut mit einer 5-fachen Objektivergrößerung angefertigt. Die Bildschirmvergrößerung betrug 160x. Das

Analyseprogramm Diskus 4.80 diente zur Ermittlung der gefäßfreien Flächen außerhalb des Präparats und der Epidermis. Anschließend wurden die Bilder einzeln auf DIN A 4 Blättern in einem Format von 15,5 cm x 20,5 cm mit einer Endvergrößerung von 98x ausgedruckt. Über diese Bilder wurde ein Weibel Grid mit $52 \times 34 = 1768$ Boxen gelegt (Weibel, 1979). Jedes Quadrat maß 45 mm x 40 mm und umfasste somit eine Fläche von 1800 mm².

Als Ereignis wurde gezählt, wenn ein Gefäßlumen oder eine CD31 positive Zelle mit der oberen linken Ecke einer einzelnen Box zusammenfiel. Teilt man nun die Gesamtanzahl positiver Ereignisse durch die Fläche des Auswertungsgrids (= alle Boxen, die das Präparat, ausschließlich der Epidermis, bedecken), erhält man den prozentualen Anteil der Gefäßfläche.

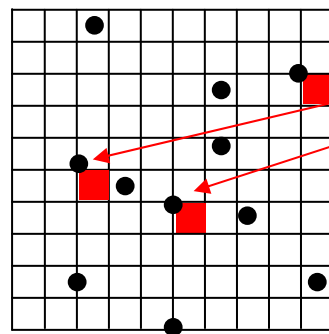


Abb. 13: Messprinzip des Weibel – Grids. Punkte, die auf eine linke obere Ecke des Grids fallen = positives Ereignis

Das Beispiel zeigt 3 positive Ereignisse in einem 10 x 10 Grid mit einer Gesamtzahl an 100 Boxen (Abb. 13). Als Ereignis zählen nur die rot hervorgehobenen Punkte, die die obere linke Ecke einer Box bedecken. Alle anderen Punkte fallen nicht mit einer oberen linken Boxenecke zusammen. Dies entspricht einer Gefäßfläche von 3%.

Dieses einfache Morphometrieverfahren eignet sich vor allem zur Ermittlung von Durchschnittswerten und hat eine hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit, solange die Gridboxgröße mit der durchschnittlichen Ereignisgröße korrespondiert.

2.11 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific Software, Erkrath, Deutschland), zur graphischen Darstellung wurde SigmaPlot 10.0 (Jandel Scientific Software, Erkrath, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung von Unterschieden zwischen einzelnen Gruppen wurde der t-Test für ungepaarte, unverbundene Daten gebraucht. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Junge Mäuse

Das Versuchstier (B-WI-29) starb vor Versuchsende und konnte nicht ausgewertet werden. 23 Tiere wurden drei Tage nach Wundverschluss euthanasiert und ausgewertet.

3.1.1 Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses

Die Abbildung 14 zeigt einen annähernd linearen Verlauf des prozentualen Wundverschlusses, wobei die Kurven der Test- und Kontrollgruppe nahezu parallel verlaufen. Die Kontrollgruppe zeigte eine Tendenz zur schnelleren Heilung. Innerhalb der Testgruppe traten stärkere Streuungen auf. Für Mittelwerte, Standardabweichungen und die statistische Auswertung siehe Tabelle 3.

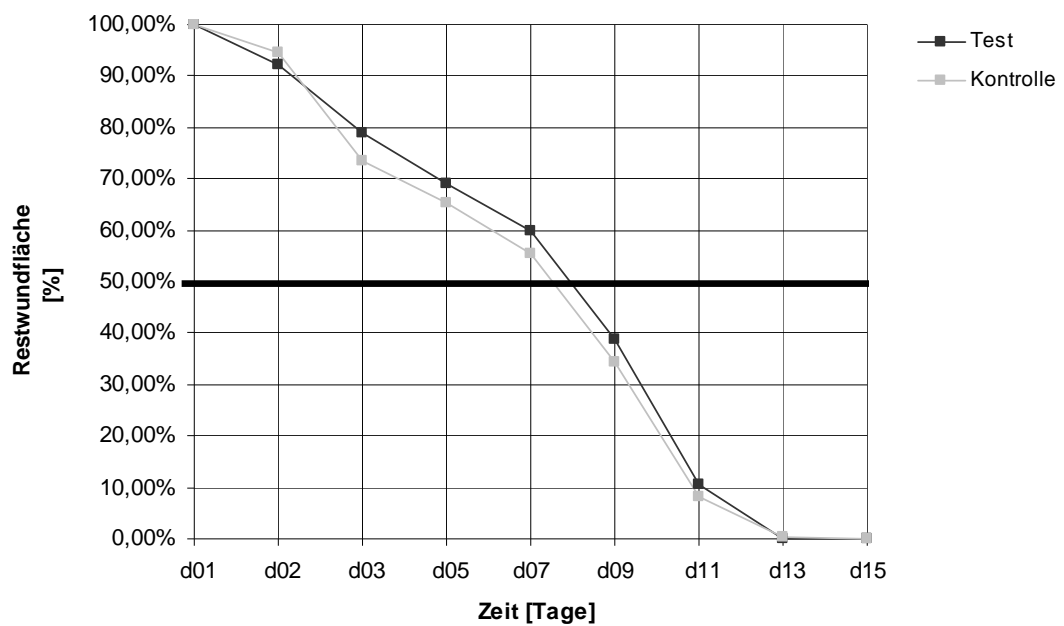


Abb. 14: Heilungsverlauf ausgedrückt in % Restwundfläche von jungen Test- und Kontrolltieren im Vergleich. d = Tag

Tag	Mittelwerte [%]		Standardabweichung		p-Werte
	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test	Kontrolle vs Test
1	100,00	100,00	0,00	0,00	
2	94,51	92,26	5,69	11,19	0,271
3	73,60	78,93	11,69	13,66	0,158
5	65,19	68,92	10,85	14,98	0,250
7	55,56	59,82	6,80	14,03	0,181
9	34,34	38,62	3,94	19,34	0,233
11	8,31	10,39	3,73	4,00	0,106
13	0,31	0,08	0,89	0,22	0,211

Tab. 3: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der noch verbleibenden Wundfläche im Vergleich. vs = versus

50% Wundverschluss wurde bei der Kontrollgruppe an Tag 7,5 erreicht. Die Testgruppe benötigte dafür bis Tag 8. Die ersten Wunden waren am Tag 11 post OP vollständig ($\geq 95\%$ Wundverschluss) verschlossen. Am Tag 14 waren alle Wunden vollständig verschlossen (Abb. 15). Abbildung 16 zeigt exemplarisch Bildtafeln eines typischen Heilungsverlaufes aus jeder Gruppe.

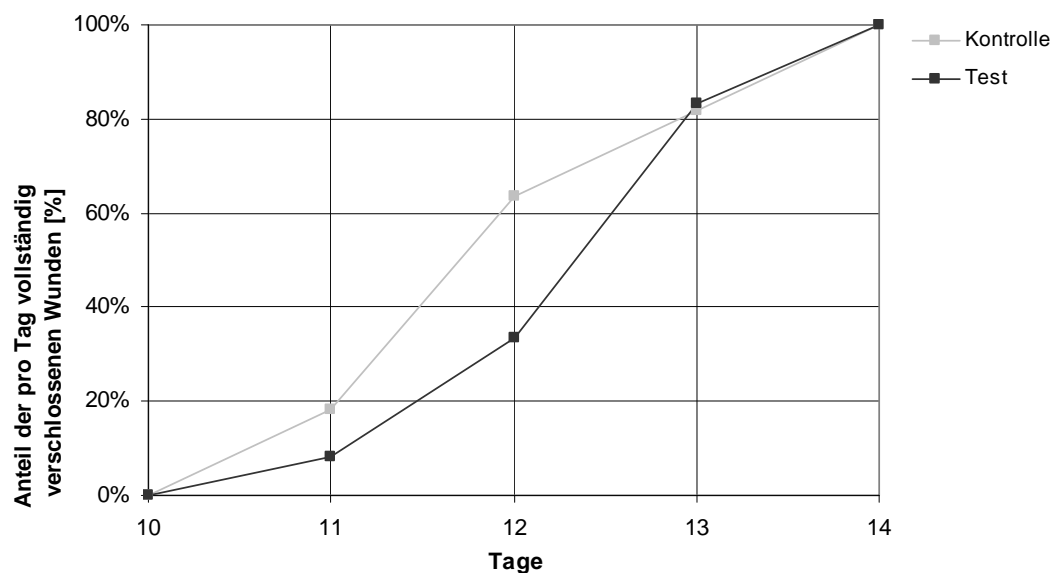


Abb. 15: Prozentualer Anteil an Tieren mit vollständig verschlossenen Wunden ($\geq 95\%$) pro Tag.

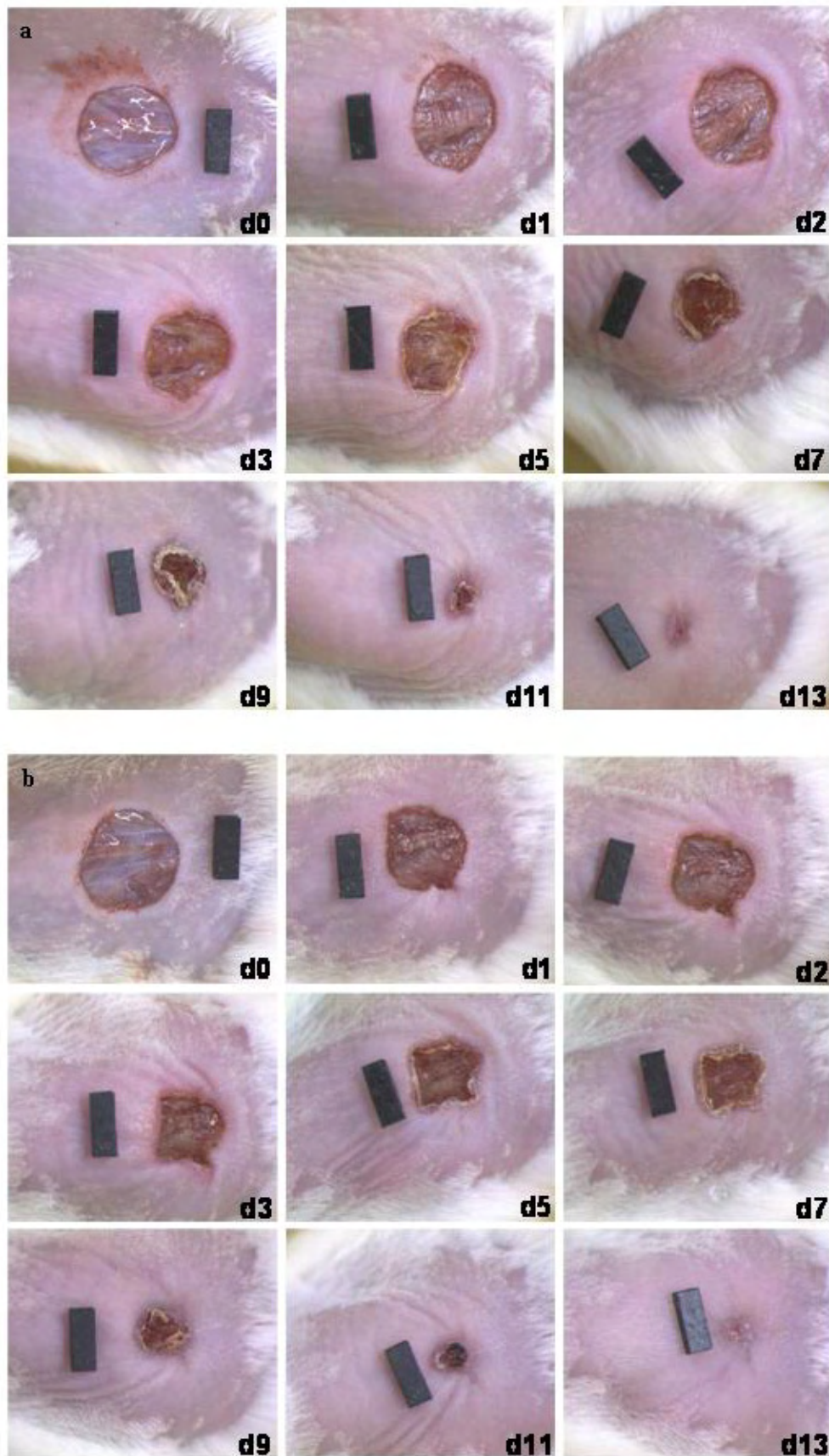


Abb. 16: Typische Beispiele eines Wundheilungsverlaufs aus der Kontrollgruppe (**a**; B-WI-11) und Behandlungsgruppe (**b**; B-WI-08) beginnend von der Wundsetzung (d0) bis zum völligen Wundverschluss. Zu sehen ist der rasierte Rücken der Maus im Lendenwirbelbereich mit der gesetzten Defektwunde. Messbalkenlänge = 5 mm; d = Tag

3.1.2 Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale

Zugbelastbarkeit

Am dritten Tag nach Wundschluss wurde von den Wunden ein Teststreifen für die mechanische Zug-Dehnungs-Zerreißprobe als funktioneller Endpunkt gewonnen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mechanischen Belastbarkeit des Narbengewebes zwischen Kontroll- und Testgruppe (Abb. 17). Die mechanische Belastbarkeit bewegt sich für die Kontrolltiere im Mittel um 1,121 N und für die Testtiere um 1,025 N. Die mechanische Belastbarkeit unverletzter Haut liegt im Vergleich dazu bei 3,2 N. Am dritten Tag nach Wundschluss (100% Wundverschluss), also zwischen dem 15. und 17. Tag post OP, lag die Reißfestigkeit des Narbengewebes der Kontrollgruppe bei 35% und der Testgruppe bei 32% der Reißfestigkeit unverletzter Haut.

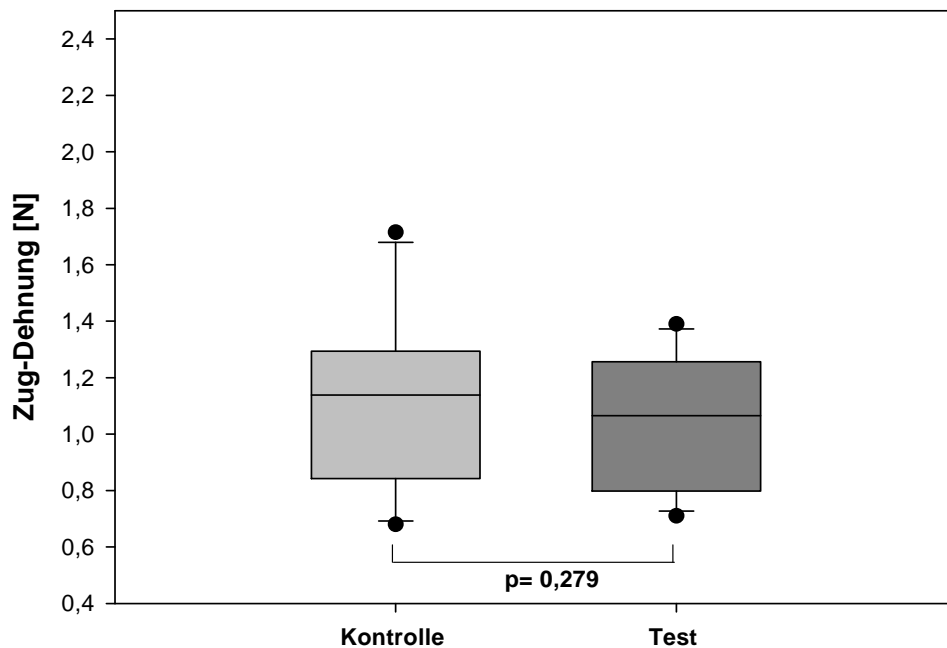


Abb. 17: Vergleich der mechanischen Belastbarkeit des Narbengewebes junger Test- und Kontrolltiere drei Tage nach vollständigem Wundverschluss. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentil, sowie 10. und 90. Perzentile (Whiskers). N = Newton

3.1.3 Monitorierung der Bestrahlungseffekte durch Infrarotthermographie

Bei vier ausgewählten Testtieren (B-WI-06, B-WI-07, B-WI-08, B-WI-09) wurde am ersten Behandlungstag eine sequentielle Verlaufskontrolle der Wundtemperaturen nach der Bestrahlung durchgeführt. Die erste thermographische Messung fand vor der Bestrahlung statt. Die Tiere zeigten hier eine durchschnittliche Wundtemperatur von 32,86°C (Variation zwischen min. 32,28°C und max. 33,36°C). Die Wundtemperaturen lagen 0,56 bis 0,89°C unter der Hauttemperatur, gemessen an unverletzter, rasierter Haut nahe dem Wundgebiet. Abbildung 18 zeigt exemplarisch ein Infrarot-Thermographieprofil eines behandelten Tieres.

Unmittelbar nach der Bestrahlung stiegen die Wundtemperaturen um 1,02-2,73°C auf durchschnittlich 34,81°C an. Im Folgenden zeigte sich eine schnelle Abkühlung schon nach 15 min, die allerdings außer bei Tier B-WI-07 nicht ganz die Ausgangstemperaturen erreichte (Abb. 19 a). Es konnte kein lang anhaltender Wärmeeffekt der wIRA auf die Wunde nachgewiesen werden. Auch nach der Bestrahlung und im weiteren Abkühlungsverlauf bleiben die Wundtemperaturen um 0,5-1°C hinter den Hauttemperaturen zurück (Abb. 19 b).

Im Folgenden zeigte die Wundtemperatur regelmäßige Peaks nach der Bestrahlung (Abb. 20; Erwärmung von min. 1,39°C bis max. 2,91°C). Der Messzeitpunkt vier Stunden nach der Behandlung sollte den Wundtemperaturzustand unabhängig von der Bestrahlung zeigen, um eventuelle Langzeitwirkungen zu dokumentieren und vergleichbare Messwerte zu den scheinbestrahlten Kontrolltieren zu erhalten. Nach vier Stunden ist die Wunde wieder deutlich abgekühlt. Es ist keine Entwicklung der Wundtemperaturen über den Behandlungszeitraum zu erkennen. Die Wundtemperaturen der Kontroll- und Testtiere lagen bis einschließlich Tag 12 post OP konstant unter den Hauttemperaturen. Am Tag 14 zeigten zwei der Tiere eine wärmere Wunde als die Haut.

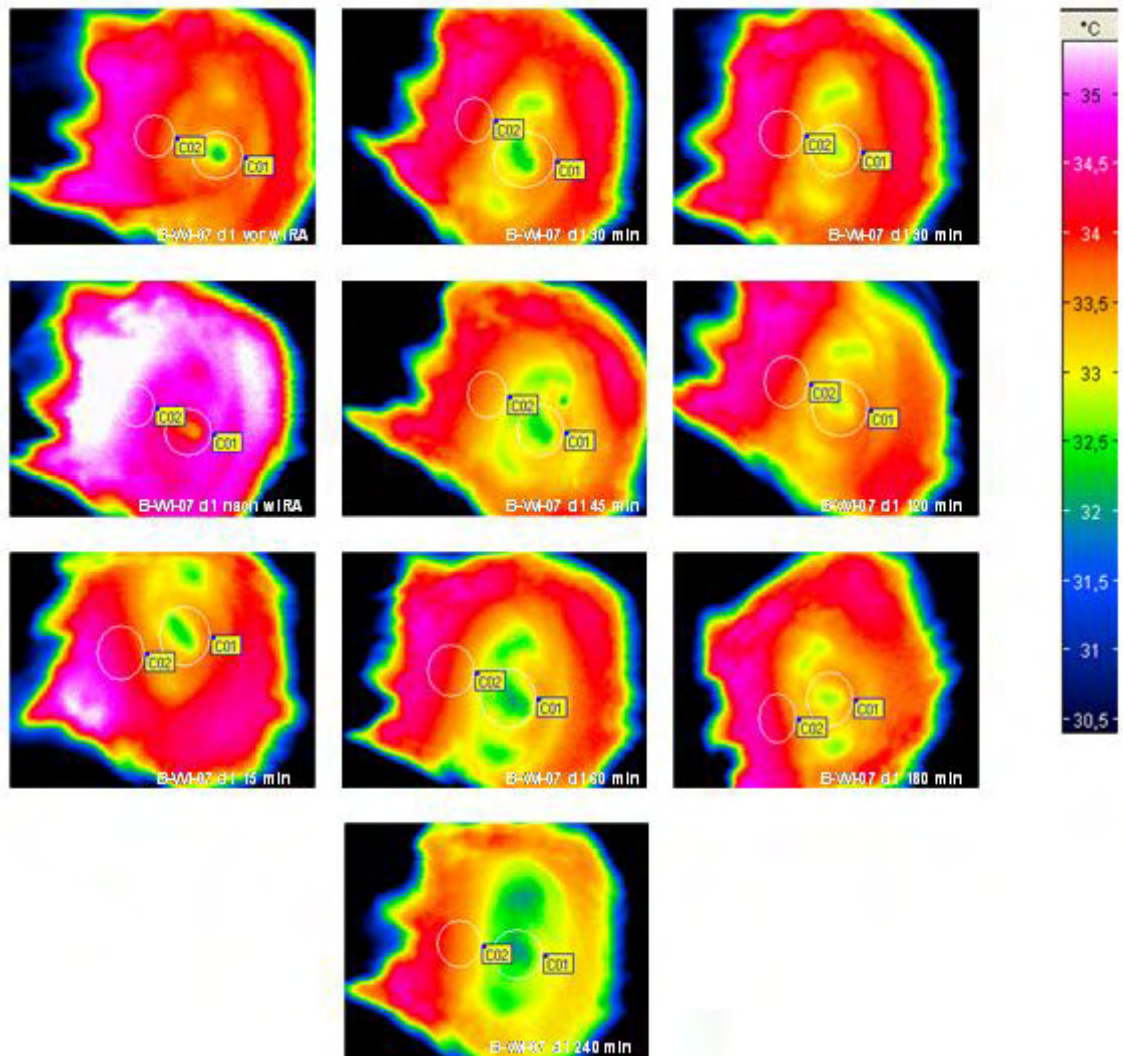


Abb. 18: Infrarot-Thermographiepanel eines Testtieres (B-WI-07) nach der ersten Bestrahlung. Zu sehen ist der rasierte Rücken der Maus im Lendenwirbelbereich. Die erste Thermographie (links oben) fand vor der wIRA Bestrahlung statt, die zweite (links Mitte) direkt danach. Die folgenden Thermographien wurden 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min und 240 min (siehe weiße Beschriftung) nach der Bestrahlung angefertigt. Die Wunde stellt sich kühler dar (grün) als die umgebende Haut. Man erkennt die deutliche Erwärmung der Wunde und der umgebenden Haut direkt nach der wIRA-Bestrahlung und die rasche Abkühlung schon nach 15 min. Die folgenden Aufnahmen zeigen ein relativ gleichförmiges Temperaturprofil der Wunde und der umgebenden Haut. Es ist kein lang anhaltender Wärmeeffekt oder ein erneuter Temperaturanstieg des Gewebes zu erkennen. C01 markiert den Wundbereich, C02 das Referenzareal im intakten Hautbereich. d = Tag, min = Minute, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A, °C = Grad Celsius

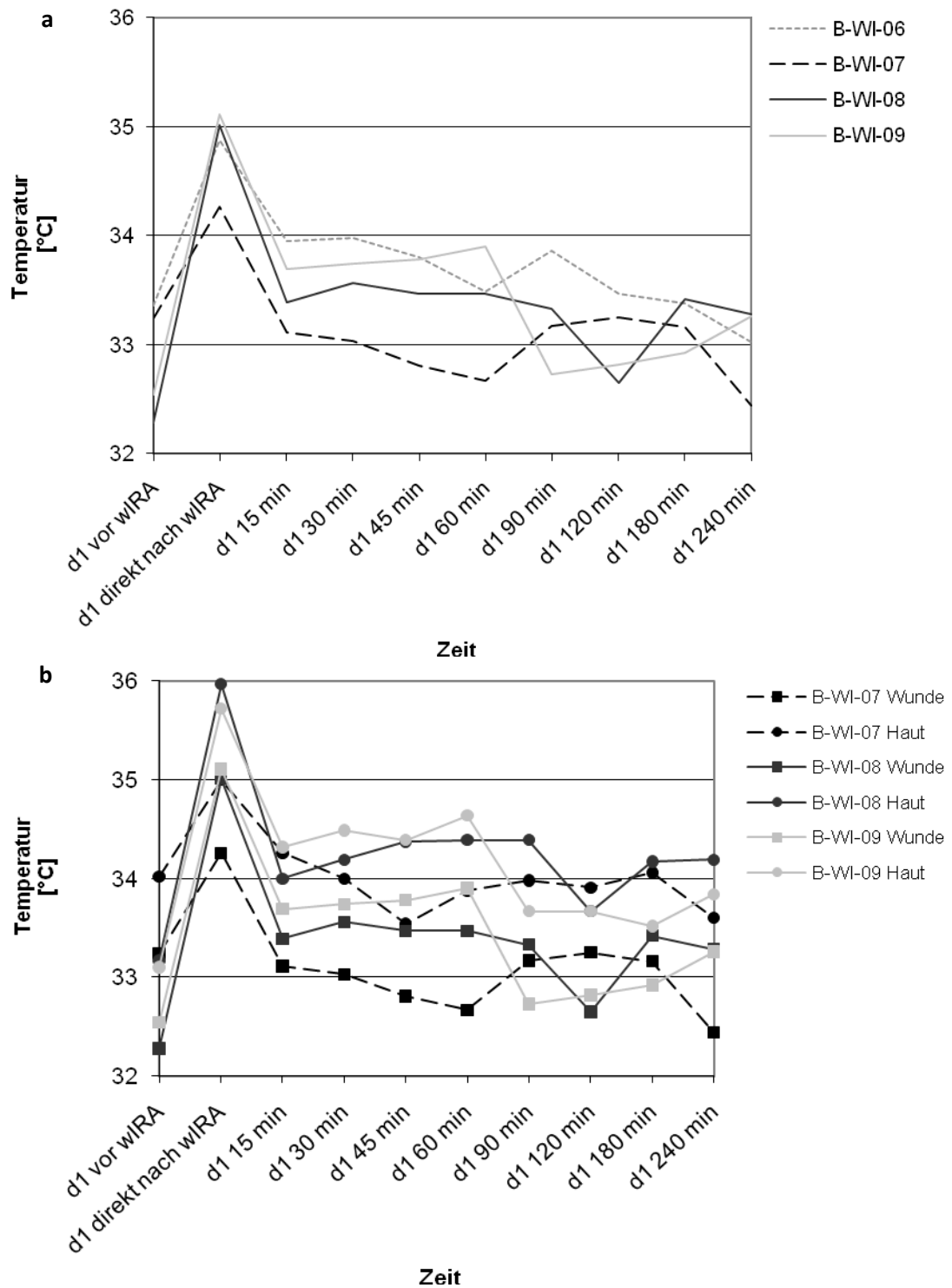


Abb. 19: **a:** Verlaufsprofil der Wundtemperatur vor und direkt nach der ersten wIRA Bestrahlung, sowie im weiteren Zeitverlauf bis 4 Stunden nach der Bestrahlung
b: Wundtemperatur im Vergleich zur Hauttemperatur vor und direkt nach erster wIRA Bestrahlung sowie im weiteren Zeitverlauf bis 4 Stunden nach der Bestrahlung.
 Die Wundtemperatur kühlt nach der Bestrahlung rasch wieder ab. Das gleiche Bild zeigt sich bei der Temperatur des umgebenden intakten Gewebes, allerdings ist dieses konstant wärmer als die Wundtemperatur. d = Tag, °C = Grad Celcius, min = Minute, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

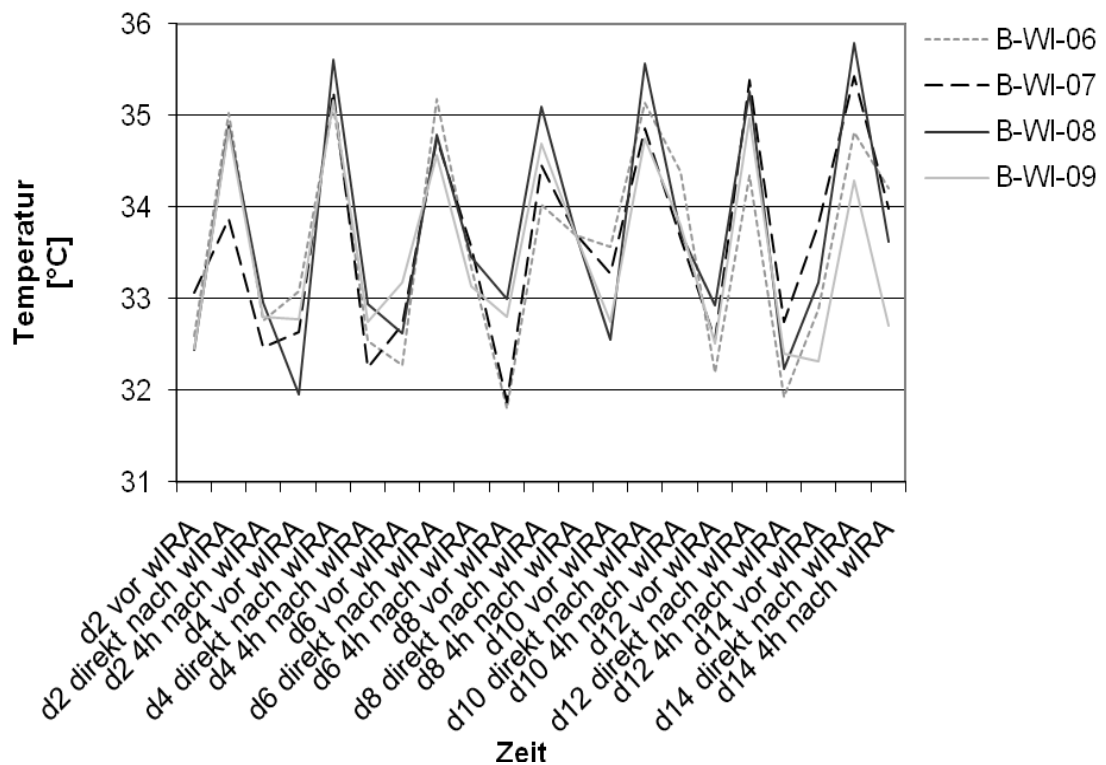


Abb. 20: Wundtemperaturverlauf der ausgewählten vier Testtiere über den gesamten Behandlungszeitraum. Die Erwärmung durch die Bestrahlung (Peaks) ist zum Zeitpunkt vier Stunden nach der Bestrahlung wieder vollständig abgekühlt. Es ist keine Entwicklung der Wundtemperaturen über den Behandlungszeitraum festzustellen. d = Tag, h = Stunde, °C = Grad Celsius, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

Die anderen Tiere wurden einmal alle zwei Tage vier Stunden nach der Bestrahlung thermographiert. Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der Wundtemperaturen von allen Test- und Kontrolltieren sowie die Mittelwerte des ΔT von Haut- und Wundtemperatur. Es ist keine Veränderung der Temperaturen über den Verlauf festzustellen. Allerdings sind die Wundtemperaturen wieder niedriger als die Temperatur intakter Haut. Ab Tag 10 ist ein langsames Angleichen der Haut- und Wundtemperaturen festzustellen.

Tag	Mittelwerte Wunde [°C]		Mittelwerte ΔT [°C]	
	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test
1	33,47		-0,76	
2	33,25	32,63	-0,55	-0,61
4	32,90	32,54	-0,55	-0,55
6	32,72	33,08	-0,70	-0,71
8	33,40	33,50	-0,67	-0,74
10	33,28	33,63	-0,31	-0,44
12	33,31	32,51	-0,08	-0,22
14	32,82	33,34	0,03	0,15

Tab. 4: Mittelwerte der Wundtemperaturen und Temperaturdifferenz (ΔT) der Wunde zur umgebenden normalen Haut von Kontroll- und Testtieren. °C = Grad Celsius, ΔT = delta Temperatur

Die durchschnittliche Wundtemperatur der Kontrolltiere ließ im Zeitverlauf ebenfalls keine Entwicklung erkennen. Auch bei den Kontrollen befand sich die Wundtemperatur auf einem niedrigeren Niveau als die Hauttemperatur. Ab Tag 10 fand eine kontinuierliche Angleichung der Temperaturen statt, die am Tag 14 in einer minimal wärmeren Wunde als Haut resultiert.

3.1.4 Schichtdicken

An den drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Proben wurde die Gesamtschichtdicke sowie die Schichtdicken der einzelnen Gewebearten im Paraffinschnitt ermittelt, um mögliche strukturelle Unterschiede im Heilungsfortschritt zu erfassen.

Etwa 70% der beurteilten Wunden befanden sich noch im Stadium der Granulation. Bei 30% war das Gewebe im Zuge einer fortgeschrittenen Heilung wieder korrekt geschichtet (Abb. 21 und 22). Zwischen Kontroll- und Testtieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Gesamtschichtdicken (Epithel bis Faszie; Abb. 23).

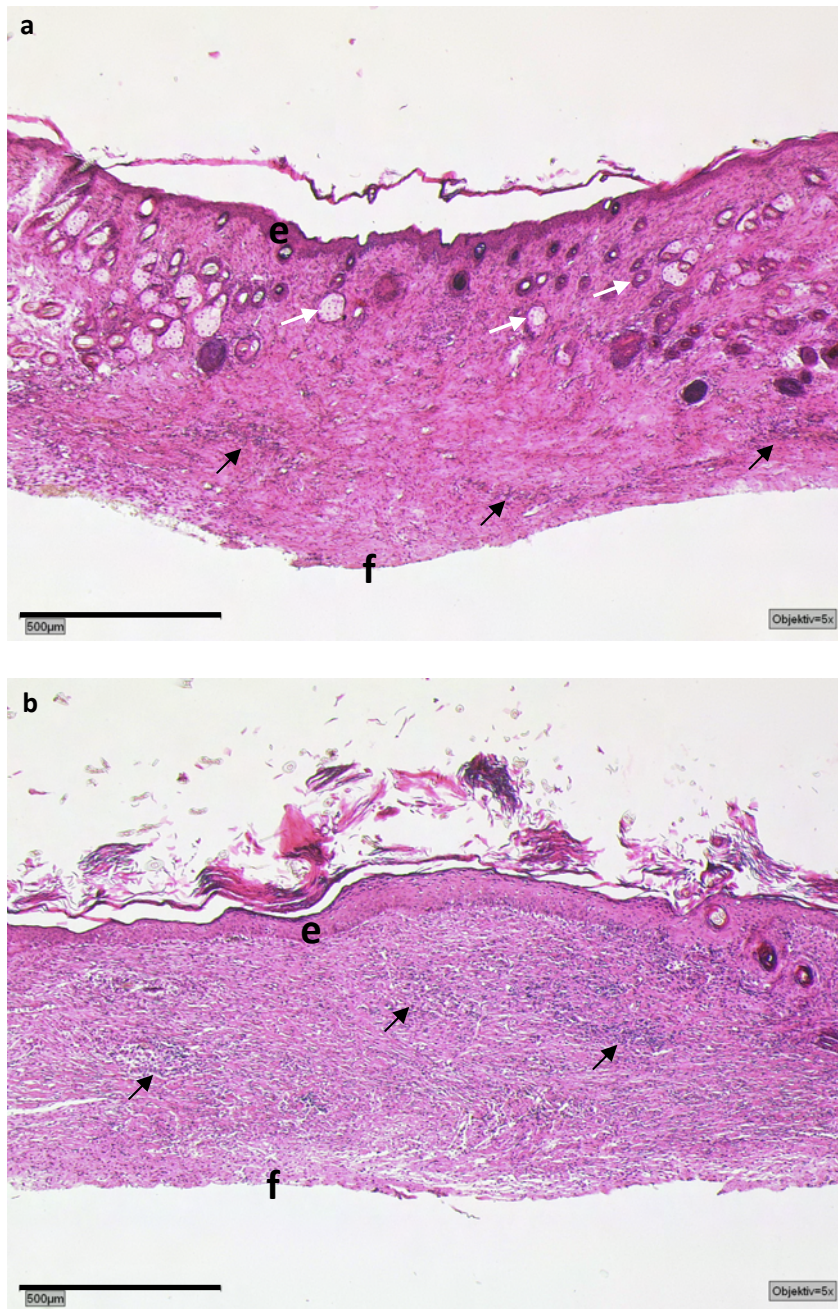


Abb. 21: Querschnitt durch die Rückenhaut im Bereich der ehemaligen Wunde eines Testtiers (**a**; B-WI-09) und eines Kontrolltiers (**b**; B-WI-28), drei Tage nach Wundverschluss. Die Epidermis (e) befindet sich oben, die Faszie (f) unten. Diese Wunden befinden sich noch im Ganulationsstadium (Granulozytennester →), eine korrekte Gewebeschichtung ist noch nicht wieder hergestellt und die Hautanhangsorgane (weißer Pfeil) sind nur in a) wieder zu erkennen. HE Färbung, schwarzer Balken = 500 μm. μm = Mikrometer

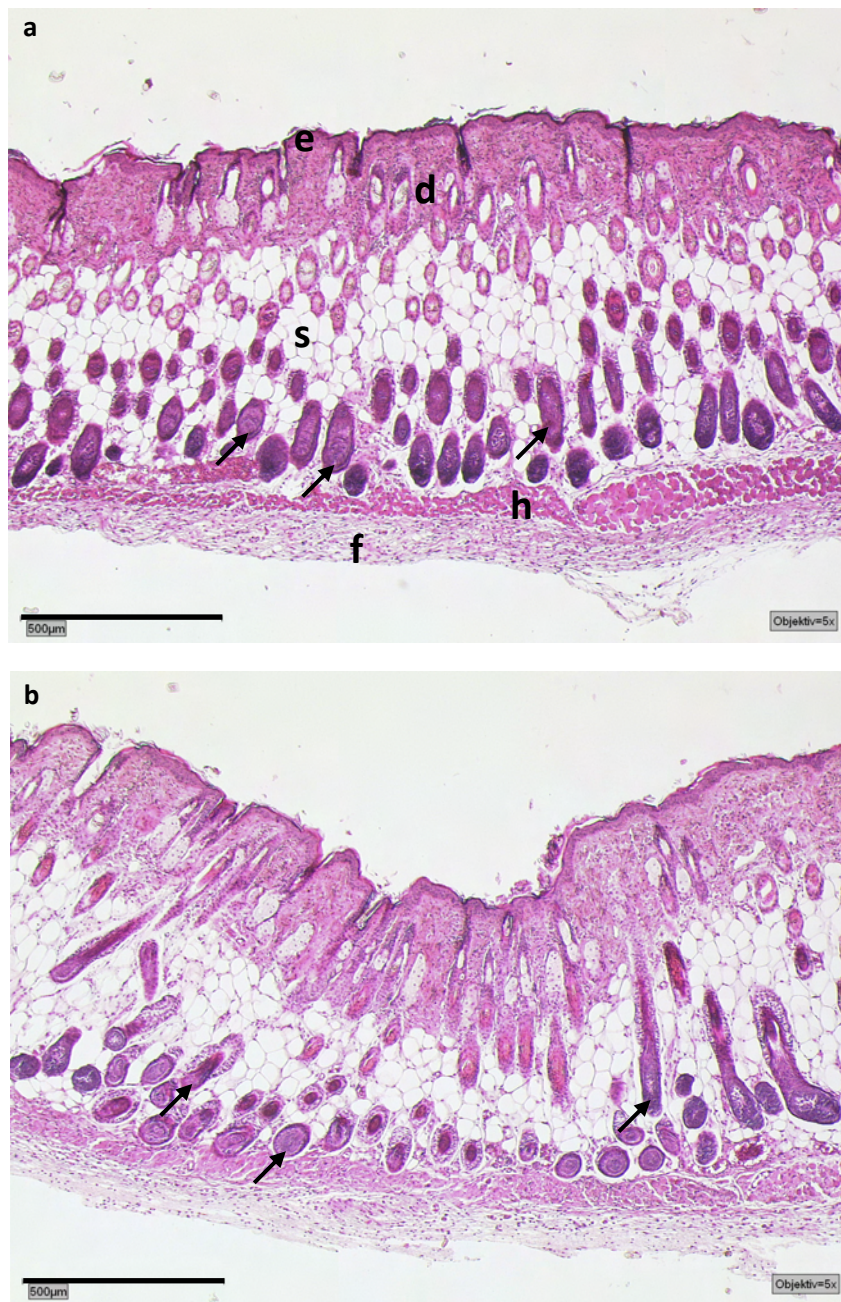


Abb. 22: Querschnitt durch die Rückenhaut eines Testtiers (**a**; B-WI-12) und eines Kontrolltieres (**b**; B-WI-17) im ehemaligen Wundbereich, drei Tage nach Wundverschluss. Diese Wunden zeigen wieder eine korrekte Schichtung in Epidermis (e), Dermis (d), Subkutis (s), Hautmuskel (h) und Faszie (f). Auffällig war, dass sich im Gegensatz zu humanen Hautdefektwunden alle Hautanhangsorgane wieder darstellen. Die Anzahl der Haarfollikel (→) erscheint sogar noch größer. HE Färbung, schwarzer Balken = 500 µm. µm = Mikrometer

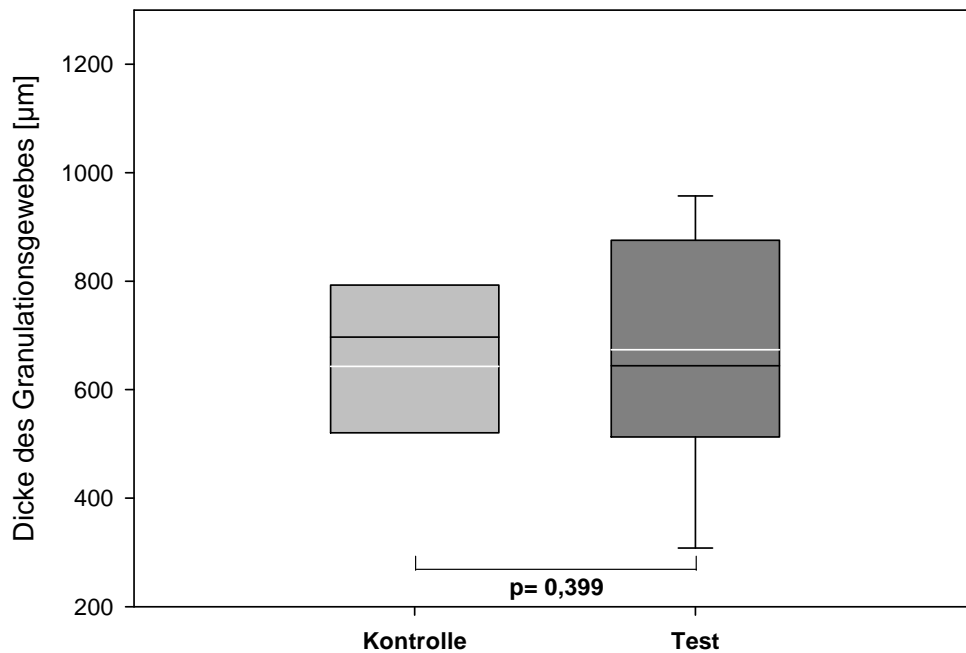


Abb. 23: Vergleich der Gesamtschichtdicke zwischen junger Kontroll- und Testgruppe drei Tage nach Wundverschluss. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, sowie 10. und 90. Perzentilen (Whiskers) und Mittelwert (weiße Linie). μm = Mikrometer

3.1.5 Kollagenfasergehalt

Der Gesamtkollagengehalt wurde mittels Falschfarbenanalyse in digitalen Photographien der Pikrin-Sirius-Rot gefärbten Präparate im Durchlicht ermittelt. Der prozentuale Gesamtkollagengehalt im Wundgebiet der Testtiere mit durchschnittlich 56,76% und der Kontrolltiere mit 56,67% unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 24 und 25). Es bestehen relativ starke Streuungen.

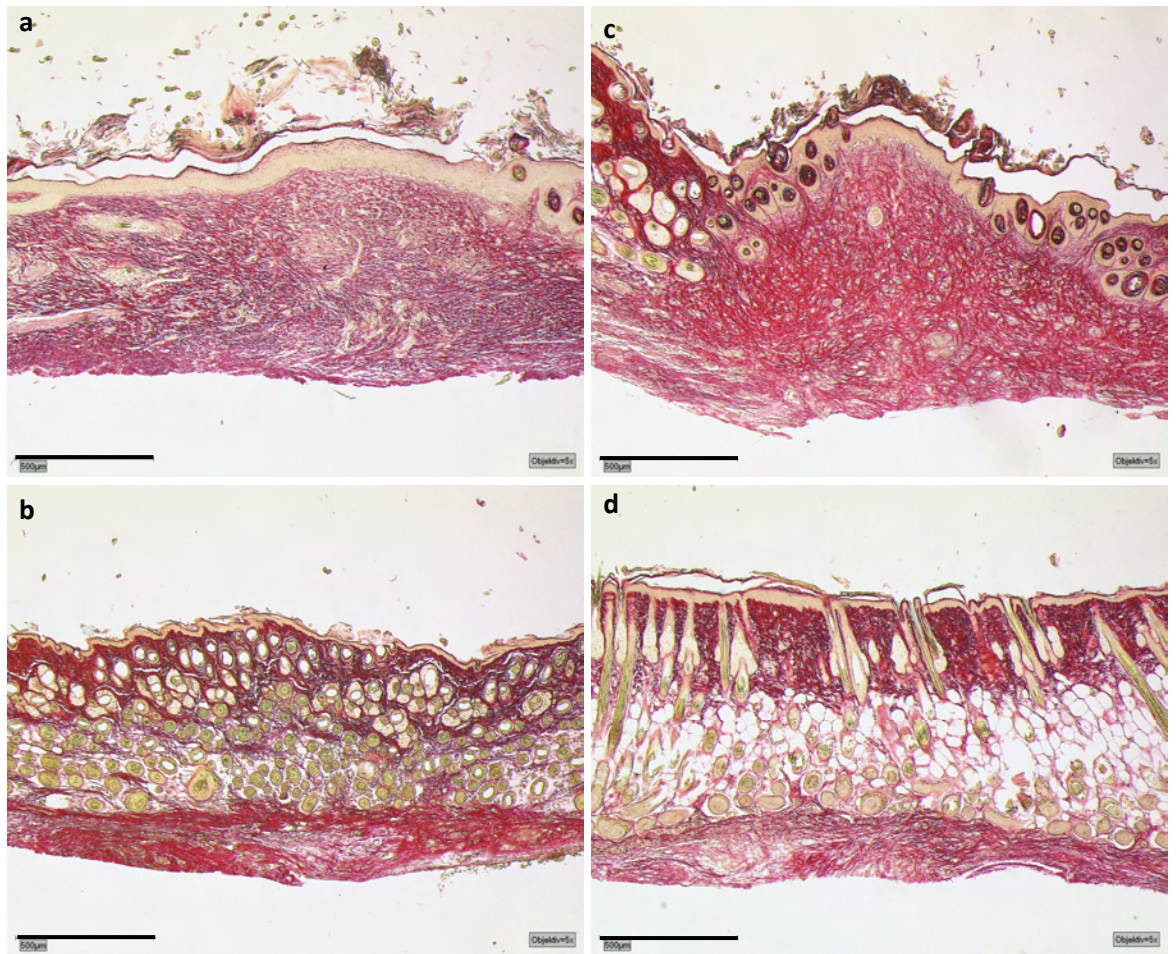


Abb. 24: Die Abbildung zeigt typische Beispiele für Wunden der Kontrollgruppe (**a, b**) und Testgruppe (**c, d**). a und c zeigen Wunden im Granulationsstadium. b und d zeigen Wunden, die bereits wieder eine korrekte Gewebeschichtung aufweisen. Die kollagenen Fasern stellen sich rot dar. Es besteht kein signifikanter Unterschied im Gesamtgehalt zwischen Test- und Kontrollgruppe. Färbung Pikrin-Sirius-Rot, Durchlicht; Objektivvergrößerung 5x, Balken = 500 μ m. μ m = Mikrometer

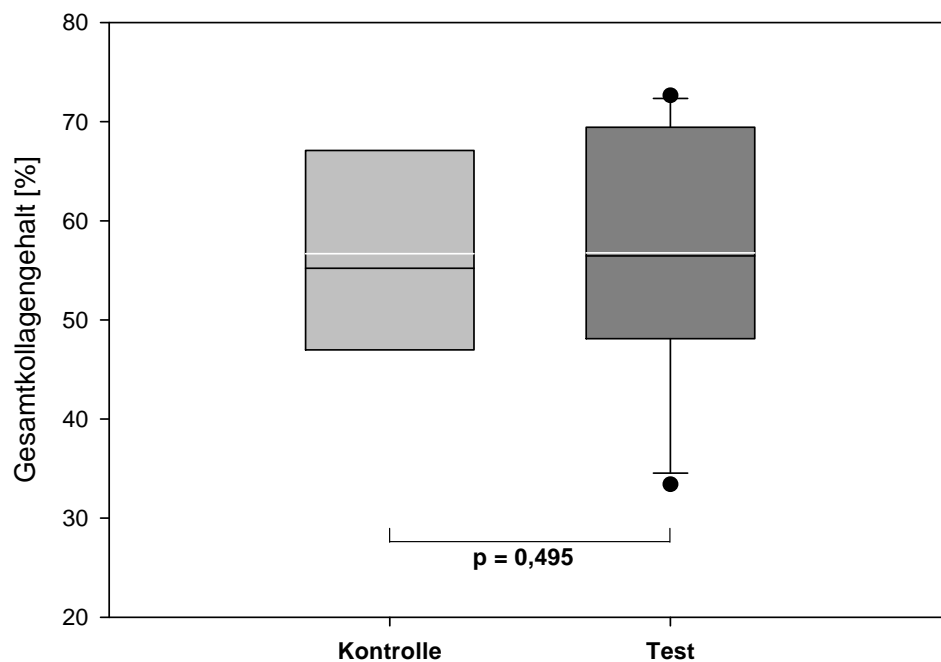


Abb. 25: Gesamtkollagengehalt der Kontroll- und Testgruppe drei Tage nach Wundverschluss im Vergleich. In der Testgruppe traten stärkere Streuungen auf. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen sowie 10. und 90. Perzentilen (Whiskers) und Mittelwert (weiße Linie).

3.1.6 Gefäßdichte

Die Gefäßdichte wurde im Wundgebiet und als Referenzwert in einem angrenzenden Gebiet intakter Haut nach anti-CD31 Markierung morphometrisch ermittelt. Abbildung 26 zeigt in jeweils einem typischen Beispiel eines Kontroll- und Testtieres, dass sich in den ehemaligen Wundarealen deutlich höhere Gefäßdichten befinden. Zwischen den wIRA-bestrahlten Wunden, mit einer durchschnittlichen Gefäßfläche von 5,43% und den scheinbestrahlten Wunden, mit einer durchschnittlichen Gefäßfläche von 6,44% bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede. Abbildung 27 zeigt die Boxplots der Gefäßdichten und die statistische Verteilung. Die Gefäßdichten in den Referenzbereichen der Kontroll- und Testgruppentiere unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant, weshalb die Daten in Abb. 27 gepoolt wurden.

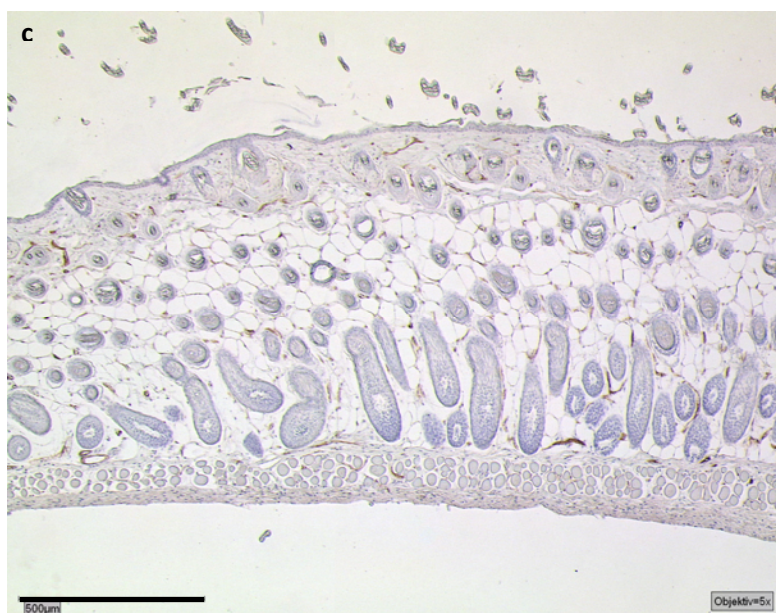
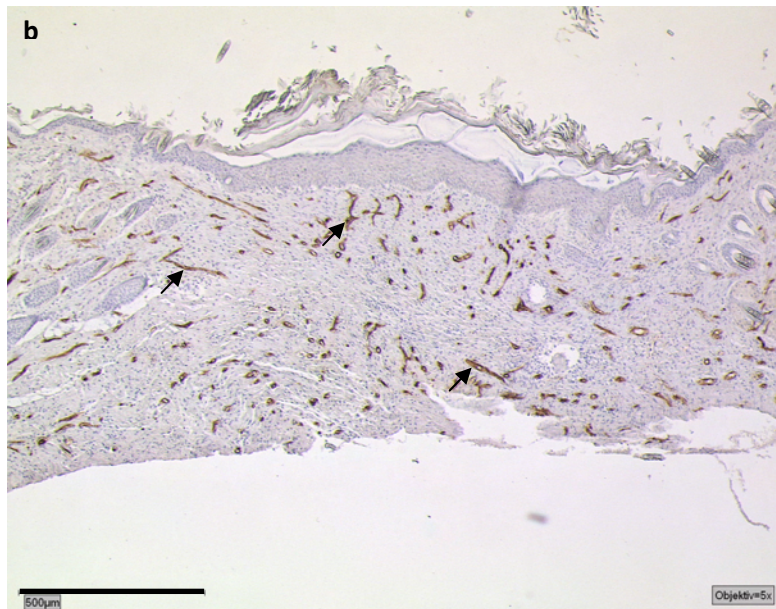
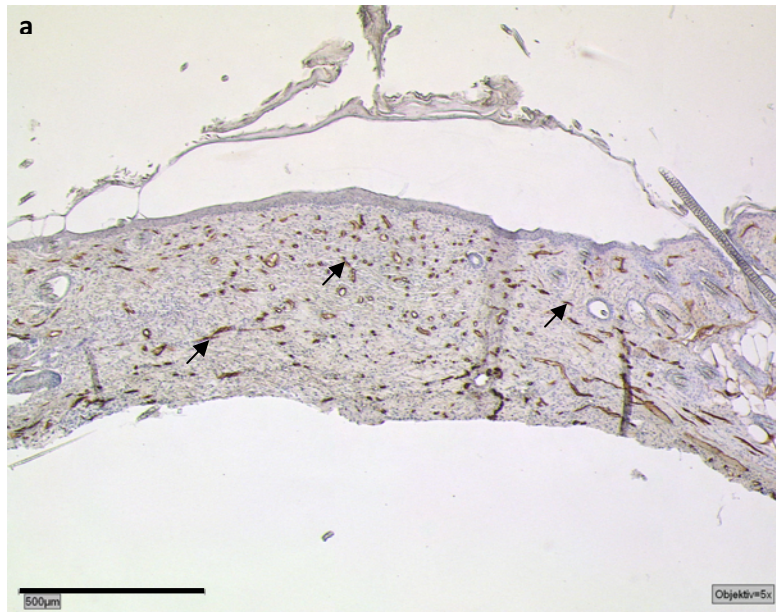


Abb. 26: Querschnitt durch die Rückenhaut eines Kontrolltieres (a; B-WI-25) und eines Testtieres (b; B-WI-14) im ehemaligen Wundbereich und im normalen Referenzareal (c), drei Tage nach komplettem Wundverschluss, mit histochemischer Darstellung der Gefäße (→) mit anti-CD31. Man beachte die deutlich höhere Gefäßdichte in a und b. schwarzer Balken = 500 μm , 54-fache Endvergrößerung. μm = Mikrometer

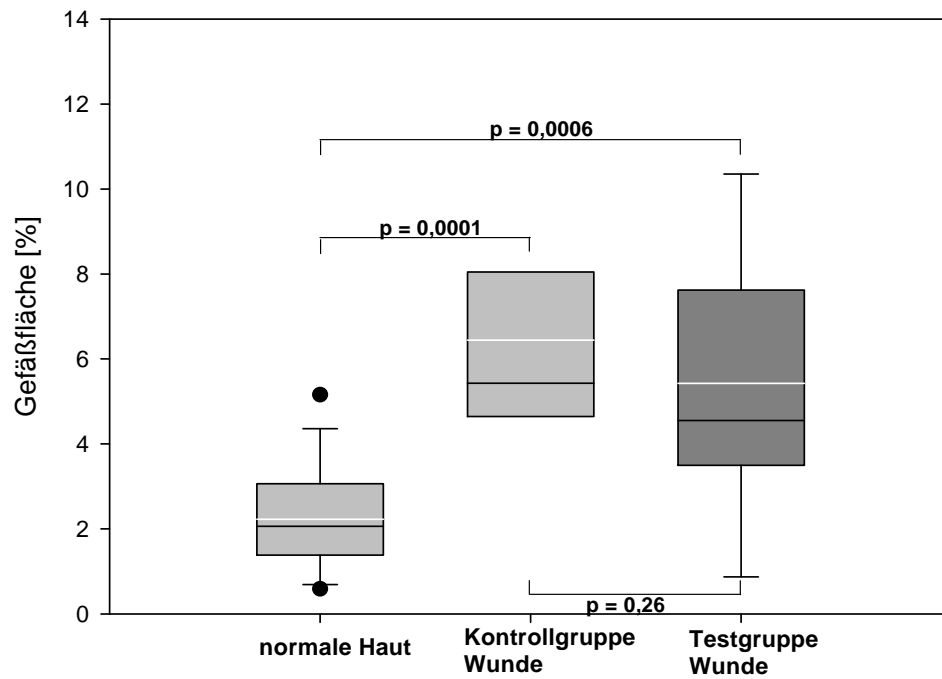


Abb. 27: Prozentuale Gefäßfläche der Kontroll- und Testgruppe im Vergleich zur normalen Haut. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentile (Punkte). weiße Linie = Mittelwert.

3.2 Alte Mäuse

Von 47 Versuchstieren konnten 14 durch letale Komplikationen während der Narkose bzw. vorzeitigem Töten aufgrund von Tumoren nicht in die Auswertung mit eingehen.

3.2.1 Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses

Die alten Tiere zeigten ebenfalls einen annähernd linearen Verlauf des prozentualen Wundverschlusses (Abb. 28). Die Kurven der Test- und Kontrollwundgrößen verlaufen parallel, wobei erneut die Kontrolltiere tendenziell schneller heilten. Die Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Sowohl in der Test- als auch Kontrollgruppe traten starke Streuungen auf.

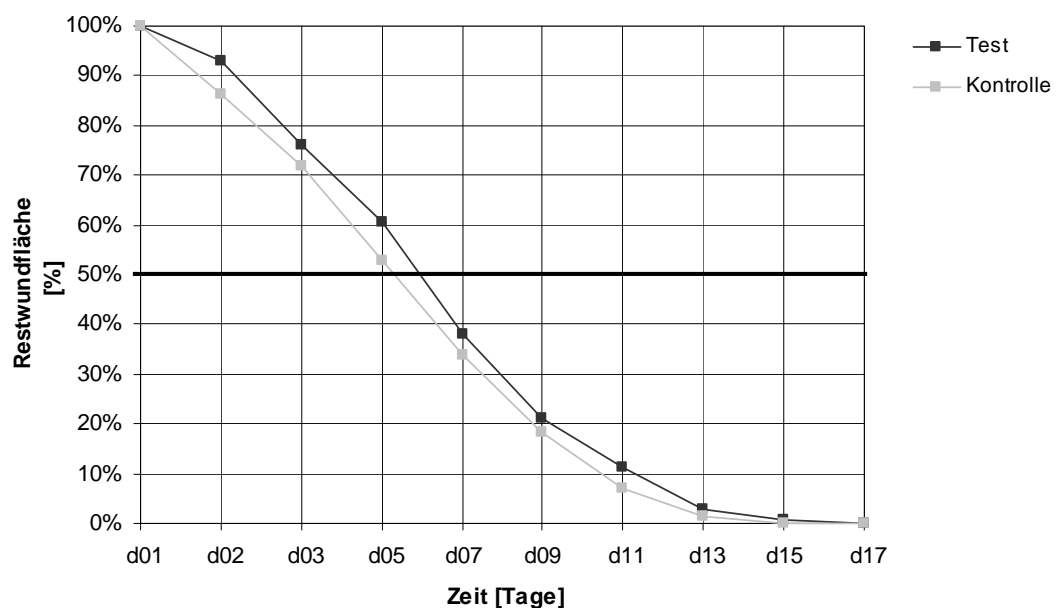


Abb. 28: Heilungsverlauf der alten Test- und Kontrolltiere dargestellt in % Restwundfläche. d = Tag

Tag	Mittelwerte [%]		Standardabweichung		p-Werte
	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test	Kontrolle vs Test
1	100,00	100,00	0,00	0,00	
2	86,14	92,83	15,10	13,21	0,090
3	71,78	75,97	15,57	13,45	0,204
5	52,84	60,66	14,15	15,91	0,070
7	33,83	38,19	10,84	12,97	0,148
9	18,35	21,05	7,99	9,25	0,185
11	7,14	11,13	4,44	7,73	0,038
13	1,25	2,89	1,32	3,93	0,060
15	0,17	0,78	0,00	1,71	0,092
17	0,00	0,15	0,00	0,61	0,167

Tab. 5: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der verbleibenden Wundfläche der Gruppen. vs = versus

50% Wundverschluss erreichte die Kontrollgruppe an Tag 5,3; die Testgruppe benötigte dafür bis Tag 6. Die ersten Wunden waren am Tag 11 post OP vollständig ($\geq 95\%$ Wundverschluss) verschlossen. Am Tag 15 waren alle Wunden geschlossen (Abb. 29).

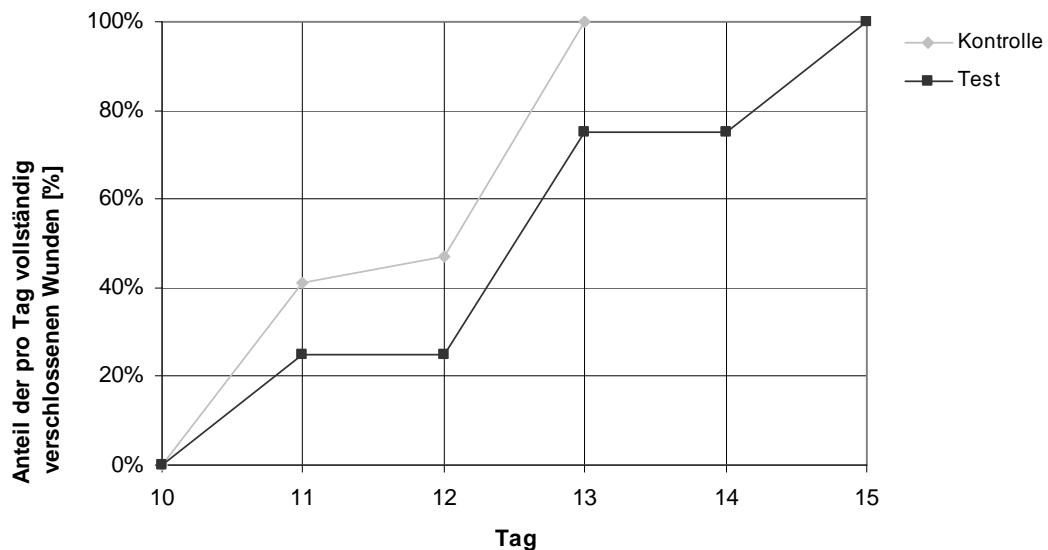


Abb. 29: Prozentualer Anteil der pro Tag komplett verschlossenen Wunden ($\geq 95\%$) von Kontroll- und Testgruppe im Vergleich.

3.2.2 Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale

Zugbelastbarkeit

Von den insgesamt 33 auswertbaren alten Tieren wurde bei 13 Tieren (6 Tests, 7 Kontrollen) 3 Tage nach Wundverschluss eine Zerreißprobe durchgeführt. Die übrigen 20 Tiere wurden 4 Wochen nach Wundverschluss euthanasiert und Gewebe für die Zug-Dehnungs-Probe entnommen, um so funktionelle Unterschiede, die sich erst in der Remodeling-Phase manifestieren, zu erfassen.

Weder zum frühen noch zum späten Entnahmezeitpunkt bestand zwischen Test- und Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in den Kräften, die zur Zerreißung der Haut erforderlich waren (Abb. 30). Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte und p-Werte.

3 d nach Wundverschluss			4 W nach Wundverschluss			Vergleich 3 d vs 4 W	
Mittelwert [N]		p-Wert	Mittelwert [N]		p-Wert	p-Werte	
Kontrolle	Test	K vs T	Kontrolle	Test	K vs T	K vs K	T vs T
1,71	1,41	0,091	1,65	1,9	0,132	0,398	0,017

Tab. 6: Mittelwerte der Zerreißprobe (Newton) an den Entnahmezeitpunkten drei Tage und vier Wochen nach Wundverschluss und die statistische Auswertung. d = Tag, W = Woche, vs = versus, N = Newton, K = Kontrolle, T = Test

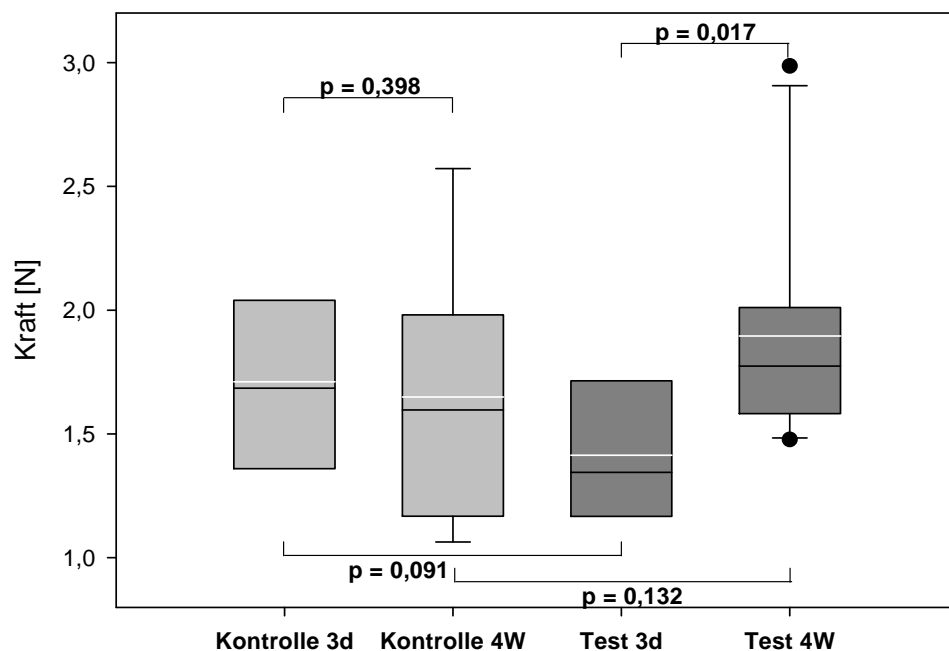


Abb. 30: Boxplots der Zug-Dehnungs-Ergebnisse der Gewebeproben, die drei Tage nach Wundverschluss und vier Wochen nach Wundverschluss entnommen wurden. Es besteht jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe. Vergleicht man die drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Proben mit denen, die vier Wochen nach Wundverschluss gewonnen wurden, zeigt die frühe Kontrollgruppe bei einem Mittelwert (weiße Linie) von 1,71 N keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe vier Wochen nach Wundverschluss mit einem Mittelwert von 1,65 N. Bei der Testgruppe hingegen verschiebt sich der Mittelwert von 1,414 N bei früher Entnahme auf 1,896 N bei später Entnahme. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert. d = Tag, W = Woche, N = Newton

3.2.3 Monitorierung der Bestrahlungseffekte durch Infrarotthermographie

Die engmaschige Verlaufskontrolle vier ausgewählter Testtiere (B-WI-30, B-WI-31, B-WI-40, B-WI-41) ergab anfängliche Wundtemperaturen vor der Bestrahlung von 32,9 bis 33,45°C. Die Temperaturen der unverletzten, rasierten Haut neben dem Wundgebiet lagen 0,39 bis 1,08°C höher als die Wundtemperaturen (Abb. 31 b). Nach der Bestrahlung stieg die Wundtemperatur zwischen 1,03 und 1,82°C an. Auch hier fand eine schnelle Abkühlung der Wunde statt, die nach 15 min bei allen Tieren

zu Werten knapp unterhalb der Ausgangstemperatur führte (Abb. 31 a). Es konnte kein lang anhaltender Wärmeeffekt der wIRA-Bestrahlung auf die Wunde nachgewiesen werden.

In den folgenden Tagen zeigten sich - wie bei den jungen Tieren - regelmäßige Peaks der Wundtemperatur nach der Bestrahlung, die am zweiten Messzeitpunkt vier Stunden nach der Bestrahlung abgekühlt waren (Abb. 32). Es war keine Veränderung der Wundtemperaturen über den Zeitverlauf zu erkennen. Die Hauttemperatur lag immer über der Wundtemperatur, wobei sich beide Temperaturen um den Tag 10 angleichen.

Auch bei den restlichen Testtieren war keine grundsätzliche Entwicklung der Wundtemperaturen im Verlauf der Behandlung zu erkennen. Hier lagen die Hauttemperaturen ebenfalls konstant über den Wundtemperaturen, was sich an den Tagen 12 bis 14 zunehmend ausglich. Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte der Wundtemperaturen aller Test- und Kontrolltiere sowie die Mittelwerte des ΔT von Haut- und Wundtemperatur.

Die Wundtemperaturen der Kontrolltiere schwankten im Mittel zwischen 31,47 und 32,22°C. Sie lagen somit durchgehend unter den Hauttemperaturen. Auch hier war ein Angleichen der Haut- und Wundtemperaturen mit fortschreitendem Heilungsprozess zu verzeichnen.

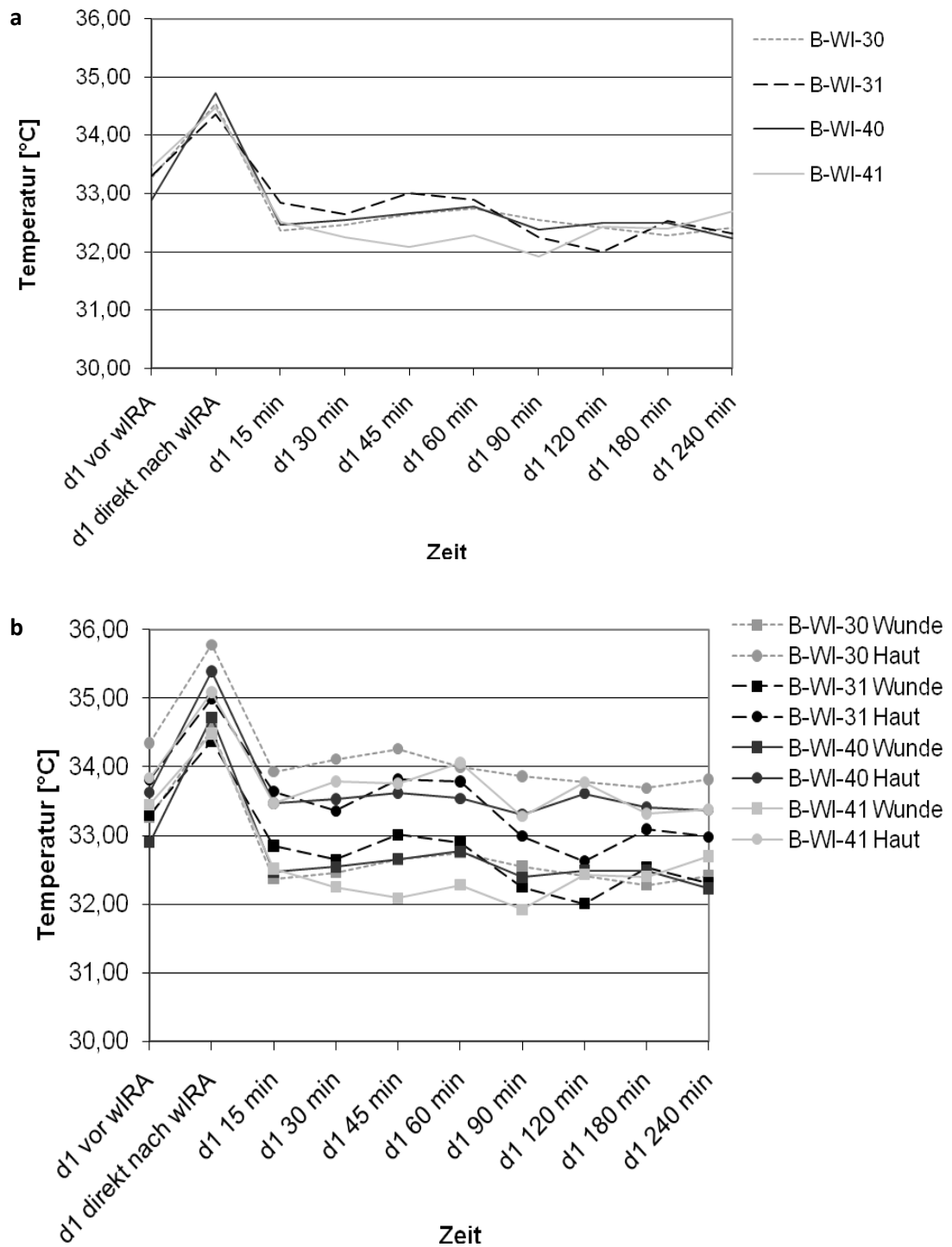


Abb. 31: Wundtemperaturprofil (a) sowie Haut- und Wundtemperatur (b) der vier Testtiere nach der ersten wIRA Bestrahlung im Vergleich. d = Tag, min = Minute, °C = Grad Celsius, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

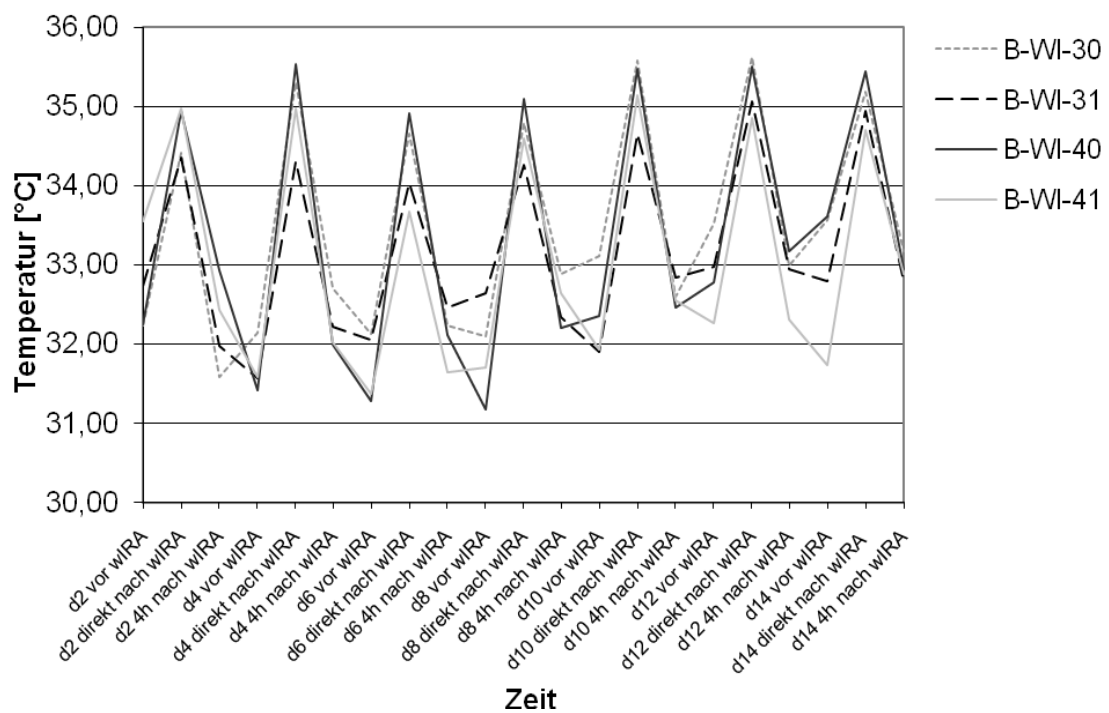


Abb. 32: Wundtemperaturverlauf der vier Testtiere im weiteren Zeitverlauf. d = Tag, h = Stunde, °C = Grad Celsius, wIRA = wassergefiltertes Infrarot-A

Tag	Mittelwerte Wunde [°C]		Mittelwerte ΔT [°C]	
	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test
2	32,17	32,17	-0,87	-0,97
4	31,47	31,87	-0,98	-1,00
6	31,92	32,06	-0,99	-1,10
8	31,58	31,73	-0,99	-0,99
10	32,11	32,14	-0,56	-0,61
12	32,12	32,19	-0,34	-0,37
14	32,22	32,18	-0,06	0,02

Tab. 7: Mittelwerte der Wundtemperaturen und ΔT (Wunde vs Haut) aller Kontroll- und Testtiere. °C = Grad Celsius, ΔT = delta Temperatur

3.2.4 Schichtdicken

Die Gesamtschichtdicken, sowie die Schichtdicken der einzelnen Gewebearten wurden an den Proben des frühen und späten Entnahmezeitpunktes ermittelt. Abbildung 33 zeigt typische Beispiele eines Querschnitts durch die ehemalige Wunde an Tag 3 und Tag 28 nach Wundverschluss.

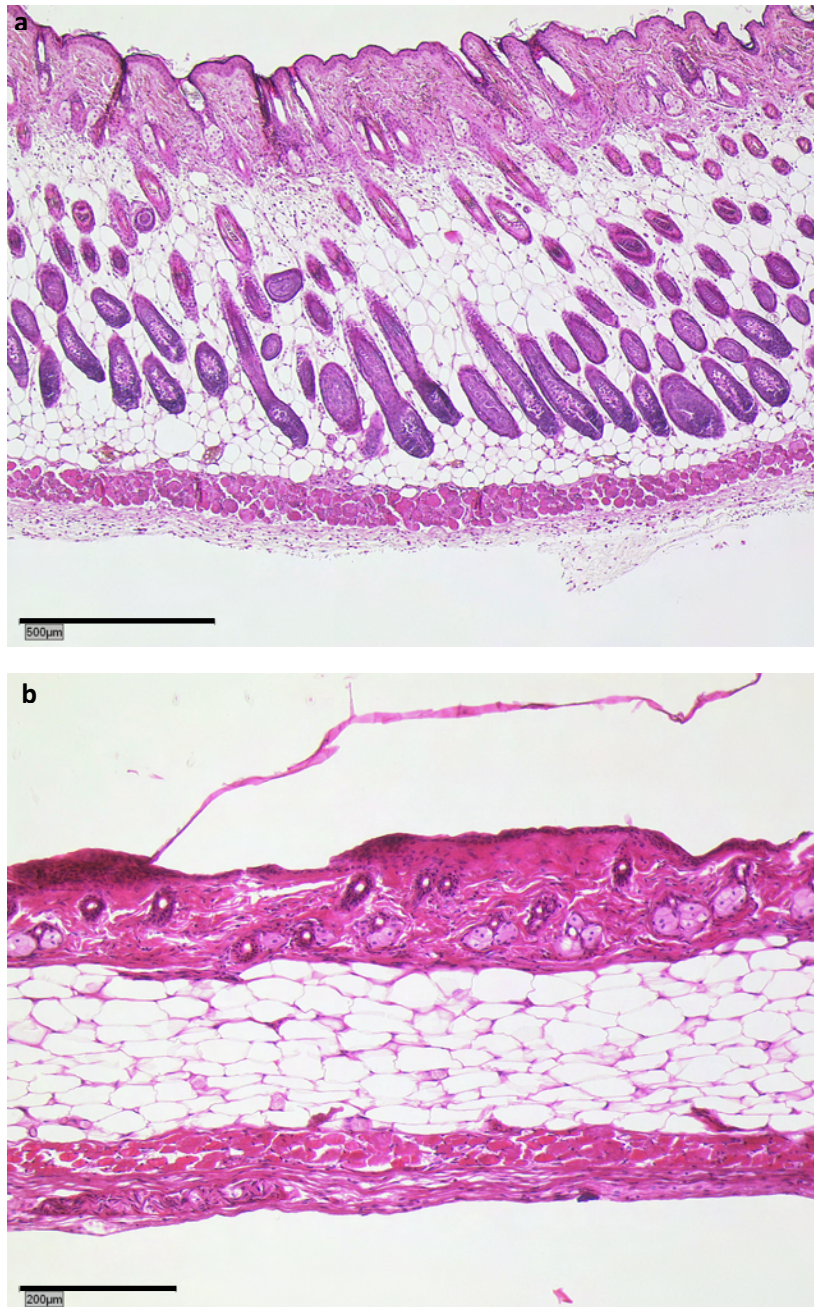


Abb. 33: Die Abbildungen zeigen HE Präparate. Man erkennt die deutliche Abnahme der Gesamtschichtdicke und Rückbildung der Hypertrichose. **a:** B-WI-53 drei Tage nach Wundverschluss entnommen mit deutlicher Hypertrichose. **b:** B-WI-48 vier Wochen nach Wundverschluss entnommen mit annähernd normaler Histologie. Objektivvergrößerung in a = 5x, in b = 10x. Balken in a = 500 μm , in b = 200 μm . μm = Mikrometer

Bei den Proben, die 3 Tage nach Wundverschluss entnommen wurden, waren 77% in ihrer Heilung soweit vorangeschritten, dass bereits eine Gewebeschichtung an Stelle des Granulationsgewebes vorlag. Es bestand kein signifikanter Unterschied in den Gesamtschichtdicken zwischen Kontroll- und Testtieren (Abb. 34 a).

In der Gruppe, bei der die Probengewinnung vier Wochen nach Wundverschluss stattfand, waren 82% der Wunden geschichtet. Auch hier lag kein signifikanter Unterschied in den Gesamtschichtdicken zwischen Kontroll- und Testtieren vor (Abb. 34 b). Allerdings bestand ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Gesamtschichtdicke der drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Proben im Vergleich zu den vier Wochen nach Wundschluss entnommenen, deren Schichtdicke deutlich geringer war (Abb. 35).

Vergleicht man die durchschnittliche Schichtdicke der Epidermis und Dermis, Subkutis und Hautmuskeldicke von Kontroll- und Testtieren miteinander, war kein signifikanter Unterschied weder zum frühen noch zum späten Entnahmezeitpunkt festzustellen. Ein jeweils signifikanter Unterschied ergab sich bei Vergleich der Gewebeschichtdicken zwischen frühem und spätem Entnahmezeitpunkt. Alle Schichtdicken nahmen mit fortschreitendem Heilungsprozess ab.

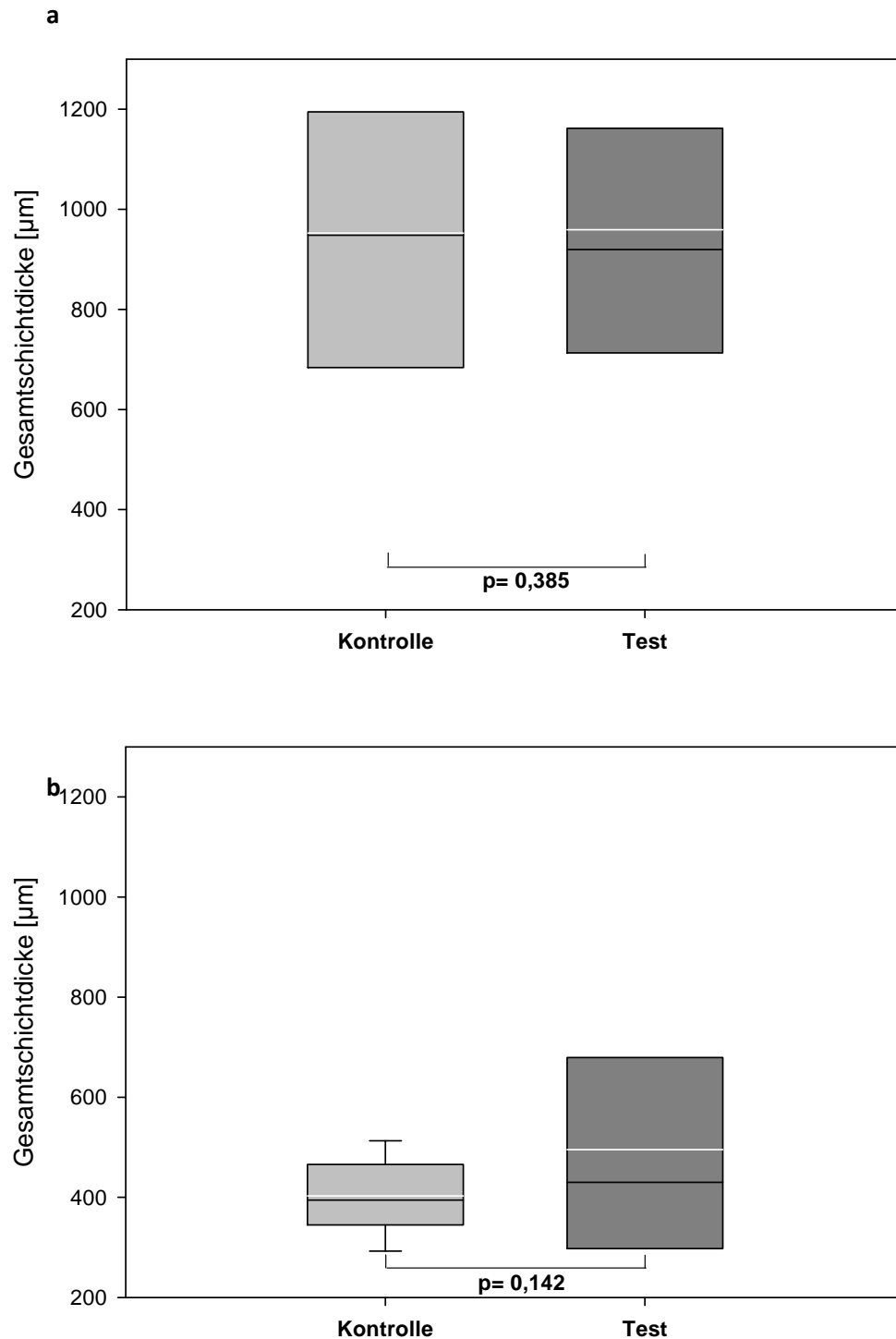


Abb. 34: Vergleich der Gesamtschichtdicken von Kontroll- und Testgruppe bei früher Entnahme drei Tage nach Wundverschluss (**a**) und später Entnahme vier Wochen nach Wundverschluss (**b**). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Testwundgewebe. Man erkennt jedoch die mit zunehmendem Heilungsfortschritt abnehmende Gesamtschichtdicke. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers). weiße Linie = Mittelwert. μm = Mikrometer

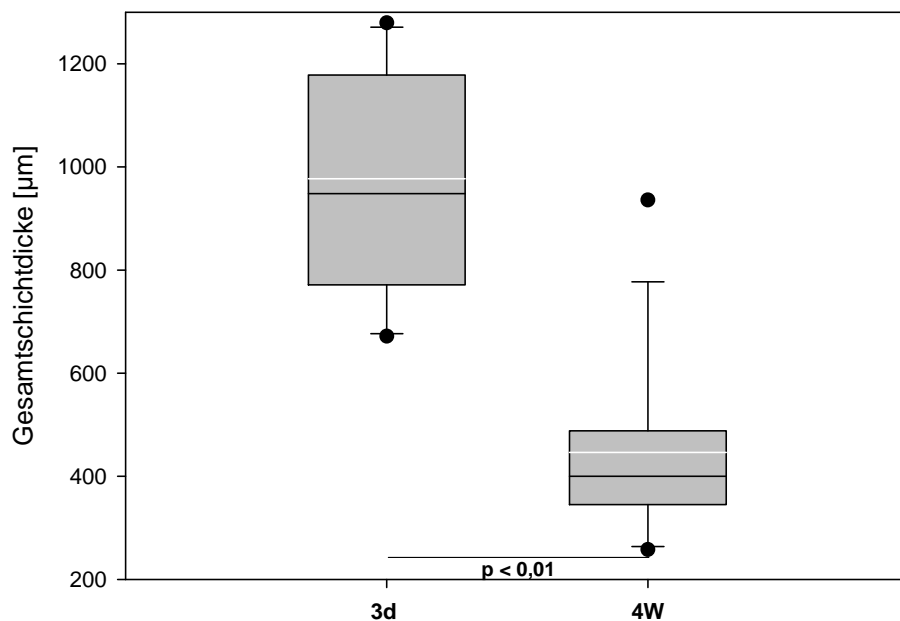


Abb. 35: Vergleich der Gesamtschichtdicke des ehemaligen Wundgewebes der früh (3 Tage nach Wundverschluss) und spät (4 Wochen nach Wundverschluss) entnommenen Proben alter Tiere. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert. d = Tag, W = Woche, µm = Mikrometer

3.2.5 Kollagengehalt

Der Gesamtkollagengehalt der Präparate der Testgruppe drei Tage nach Wundverschluss ist mit einem Mittelwert von 45,8% höher als der der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 35,89%. Es besteht allerdings keine Signifikanz (Abb. 36 a). Dieser geringe Unterschied ist zum Zeitpunkt der späten Gewebeentnahme vier Wochen nach Wundverschluss wieder ausgeglichen. Die Testgruppe hat hier einen durchschnittlichen Gesamtkollagengehalt von 45,58%; die Kontrollgruppe von 46,2% (Abb. 36 b). Der Kollagengehalt der Testgruppe ist in dem Zeitraum von vier Wochen konstant geblieben. Die Gewebeproben der Kontrollen haben ihren Kollagengehalt gesteigert, allerdings nicht signifikant ($p = 0,092$).

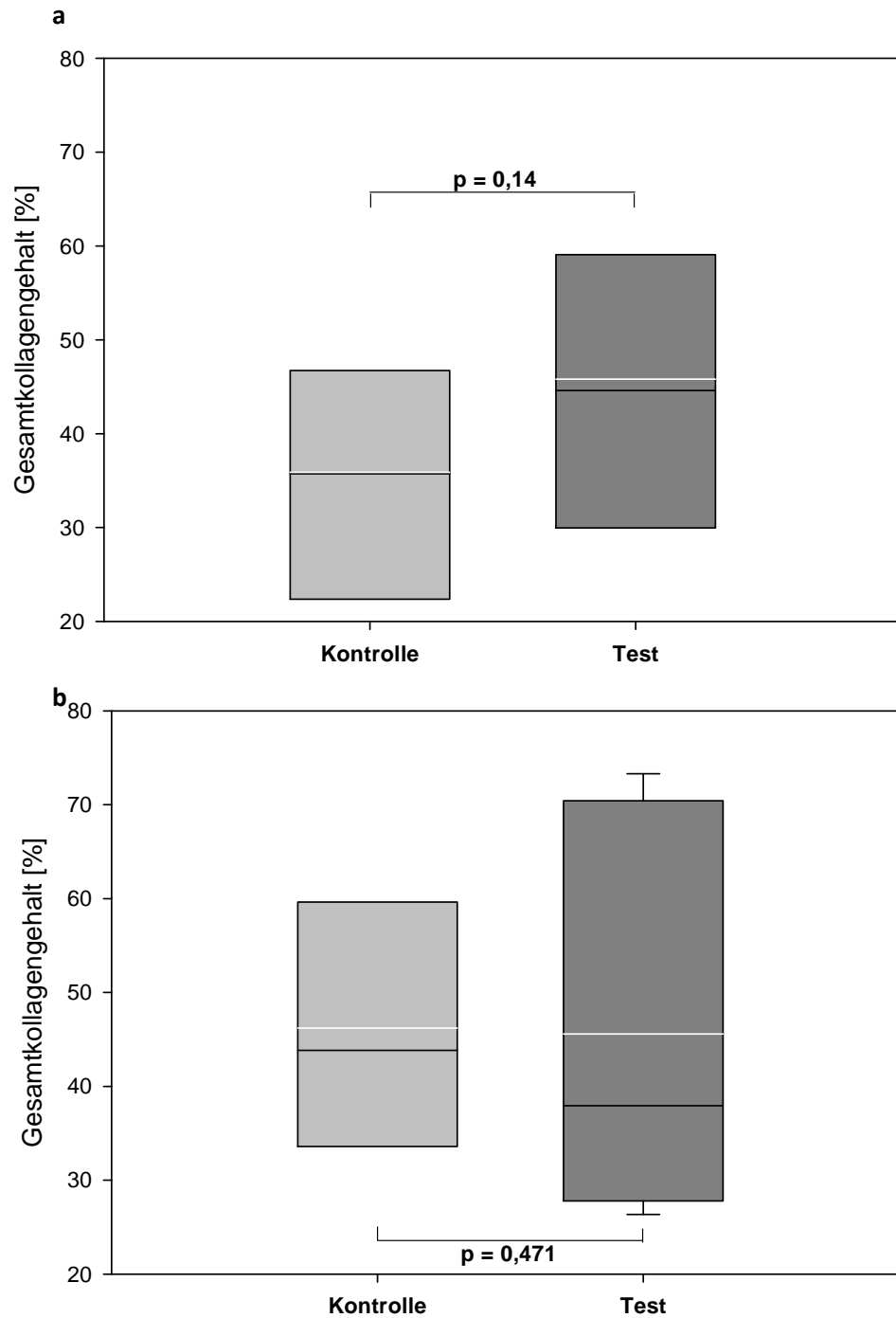


Abb. 36: Boxplots des Gesamtkollagengehaltes von Kontroll- und Testgruppen drei Tage nach Wundverschluss (**a**) und vier Wochen nach Wundverschluss (**b**). Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers). weiße Linie = Mittelwert.

3.2.6 Gefäßdichte

Die Gefäßdichte wurde im Wundgebiet und im angrenzenden Gebiet intakter Haut als Referenzwert ermittelt. Die Gefäßdichte im Wundgebiet zeigte bei den Proben, die drei Tage nach Wundverschluss gewonnen wurden, mit durchschnittlich 2,9% Gefäßfläche in der Testgruppe keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 3,09%. Abbildung 37 a zeigt die Boxplots der Gefäßdichten und die statistische Verteilung.

Bei den vier Wochen nach Wundverschluss entnommenen Proben war kein signifikanter Unterschied in der Gefäßfläche zwischen der Testgruppe mit 4,73% und der Kontrollgruppe mit 6,6% festzustellen. Die Gefäßdichten in den Referenzbereichen bei Test- und Kontrolltieren unterschieden sich jeweils ebenfalls nicht signifikant. Vergleicht man das Gefäßaufkommen im Wundbereich mit dem bei intakter Haut, ergaben sich für die Präparate, die vier Wochen nach Wundverschluss entnommen wurden, signifikante Unterschiede mit einer höheren Gefäßdichte im Wundbereich (Abb. 37 b).

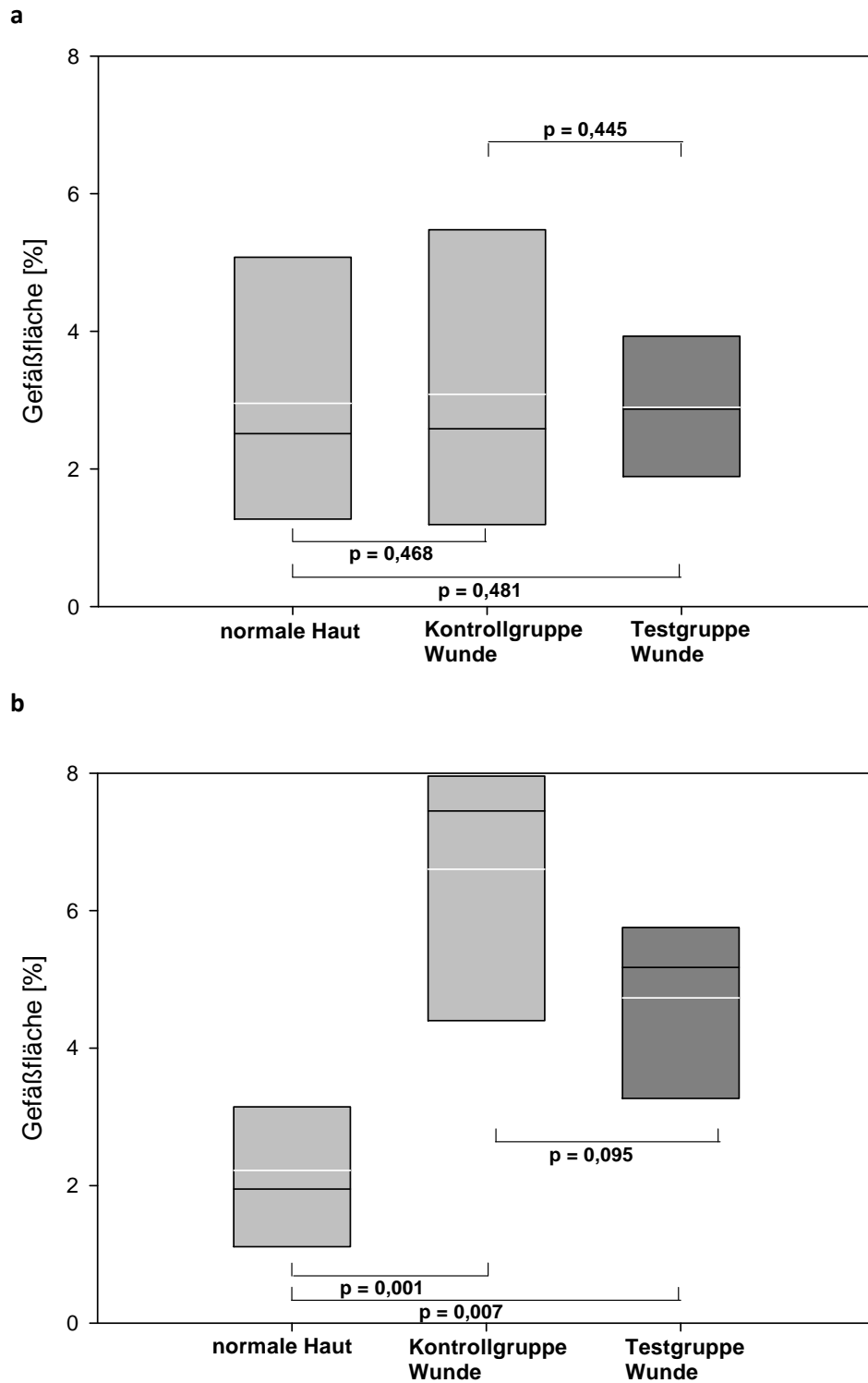


Abb. 37: Boxplots der prozentualen Gefäßflächen der Kontroll- und Testgruppe im Wundareal und im Vergleich zur normaler Haut drei Tage nach Wundverschluss (**a**) und vier Wochen nach Wundverschluss (**b**). Die Daten der normalen Haut von Kontroll- und Testtieren wurden aufgrund fehlender Signifikanz gepoolt. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers). weiße Linie = Mittelwert.

3.3 Junge und alte Mäuse im Vergleich

3.3.1 Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses

Entgegen unseren Erwartungen erreichten die alten Versuchstiere schneller als die Jungen 50% Wundverschluss (Abb. 38). Der vollständige Verschluss ($\geq 95\%$) aller Tiere erfolgte bei den jungen Mäusen am Tag 14, bei den alten Kontrollen am Tag 13 und den alten Testtieren am Tag 15.

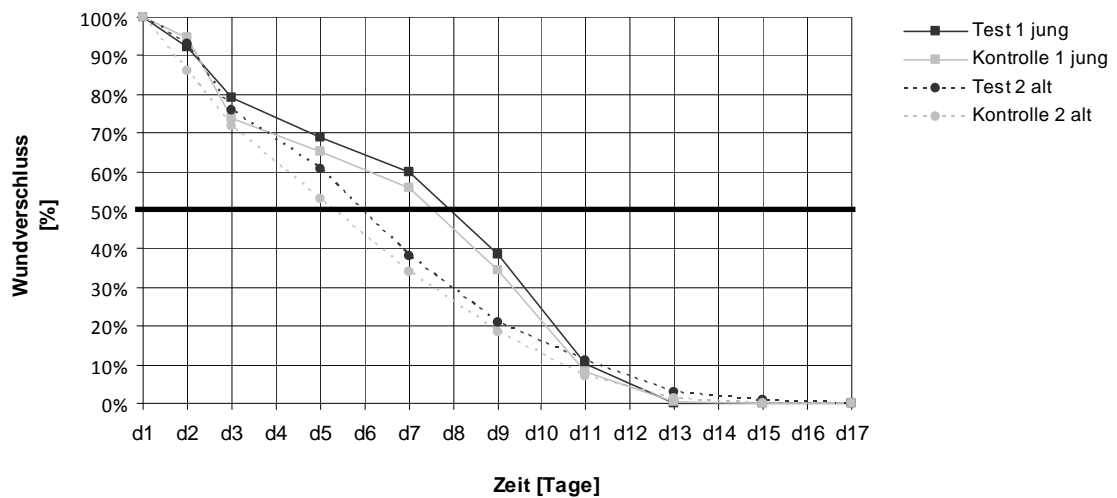


Abb. 38: Vergleich des prozentualen Wundschlusses zwischen alten und jungen Tieren. d = Tag

An den Tagen 7 und 9 waren sogar signifikante Unterschiede in der Schnelligkeit des Wundverschlusses zwischen alten und jungen Tieren zu Gunsten der alten Tiere festzustellen (Tab. 8).

Tag	Mittelwerte Restwundfläche [%]				p-Wert
	Kontrolle jung	Test jung	Kontrolle alt	Test alt	jung vs alt
1	100,00	100,00	100,00	100,00	
2	94,51	92,26	86,14	92,83	0,220
3	73,60	78,93	71,78	75,97	0,279
5	65,19	68,92	52,84	60,66	0,094
7	55,56	59,82	33,83	38,19	0,010
9	34,34	38,62	18,35	21,05	0,017
11	8,31	10,39	7,14	11,13	0,468
13	0,31	0,08	1,25	2,89	0,129
15	0,00	0,00	0,17	0,78	0,182
17	0,00	0,00	0,00	0,15	0,250

Tab. 8: Vergleich der prozentualen Restwundfläche der Gruppen im Vergleich sowie statistische Auswertung. vs = versus

3.3.2 Funktionelles Ergebnis nach Wundverschluss: maximale

Zugbelastbarkeit

Der Vergleich der Zug-Dehnungs-Werte zwischen alten und jungen Tieren ergab signifikant bessere Ergebnisse für die alten Tiere, sowohl bei der Test- als auch der Kontrollgruppe (Abb. 39).

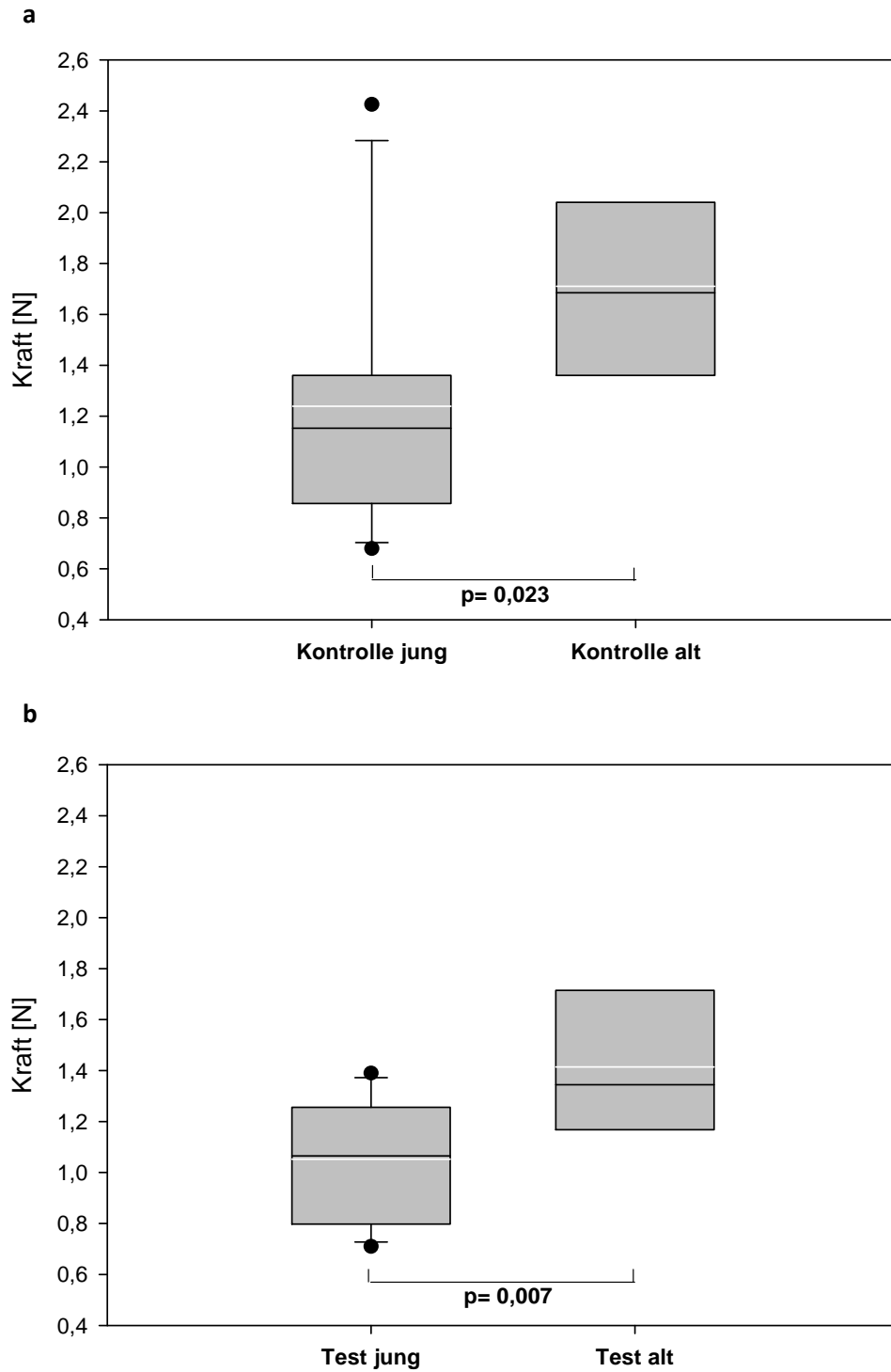


Abb. 39: Zug-Dehnungs-Ergebnisse der drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Gewebeproben junger und alter Kontroll- und Testtiere. Es bestehen jeweils signifikante Unterschiede zwischen den jungen und alten Kontroll- und Testtieren. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert. N = Newton

3.3.3 Schichtdicken

Die Gesamtschichtdicke der alten Tiere, deren Gewebe drei Tage nach Wundverschluss entnommen wurde, war im Mittel signifikant höher als die der Jungtiergruppe. Die alten Tiere, mit Entnahmezeitpunkt vier Wochen nach Wundverschluss, zeigten dann eine signifikant geringere Schichtdicke als die Jungtiere (Abb. 40).

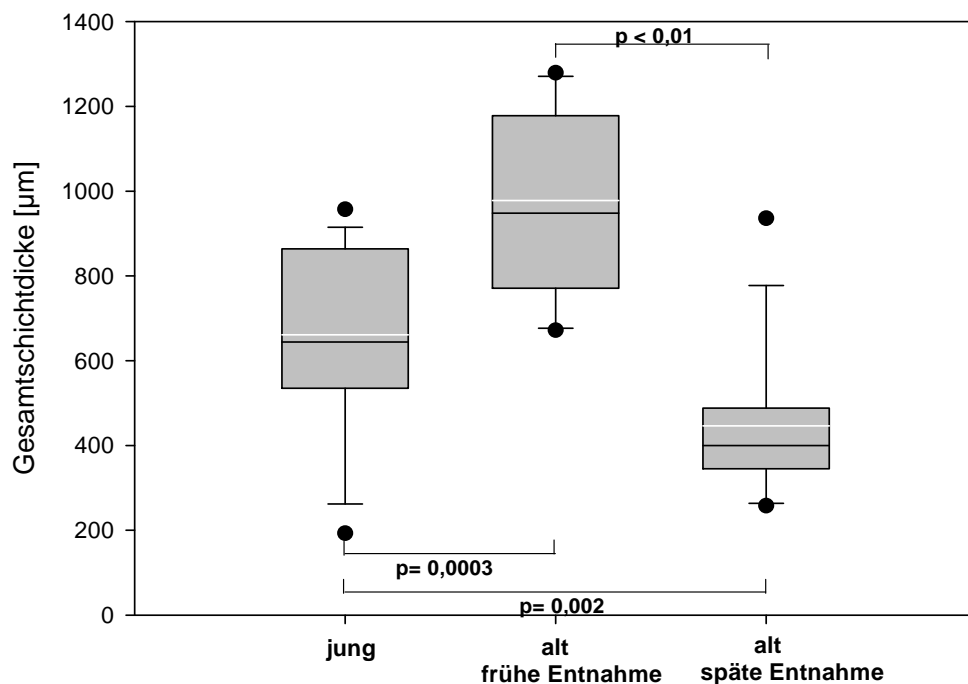


Abb. 40: Vergleich der Gesamtschichtdicke zwischen Jung- und Alttierwunden. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert. μm = Mikrometer

Im Vergleich der Gesamtschichtdicke junger und alter Tiere fällt auf, dass die Präparate der Jungtiergruppe eine signifikant geringere Gesamtschichtdicke aufweisen als die der Alttiere bei früher Entnahme. Umgekehrte Verhältnisse sind beim Vergleich mit den Alttieren bei später Entnahme festzustellen. Hier zeigen die Alttiere eine signifikant geringere Schichtdicke als die Jungtiergruppe.

3.3.4 Kollagengehalt

Beide Alttiergruppen bleiben hinter den Gesamtkollagenwerten der Jungtiere zurück, obwohl sie signifikant bessere Zug-Dehnungswerte als die jungen Tiere erzielten (Abb. 41). Es besteht demnach kein linearer Zusammenhang zwischen dem Kollagengehalt und der Reißfestigkeit der Wunde. Auffällig sind außerdem die größeren Kollagenbündel und ihre dichtere Packung in der 4-Wochen-Gruppe gegenüber den drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Proben (Abb. 42 und 43). Dies deutet auf einen erhöhten Kollagen I Gehalt und eine verbesserte Organisation der Fasern hin, was typisch für den fortschreitenden Heilungsprozess ist.

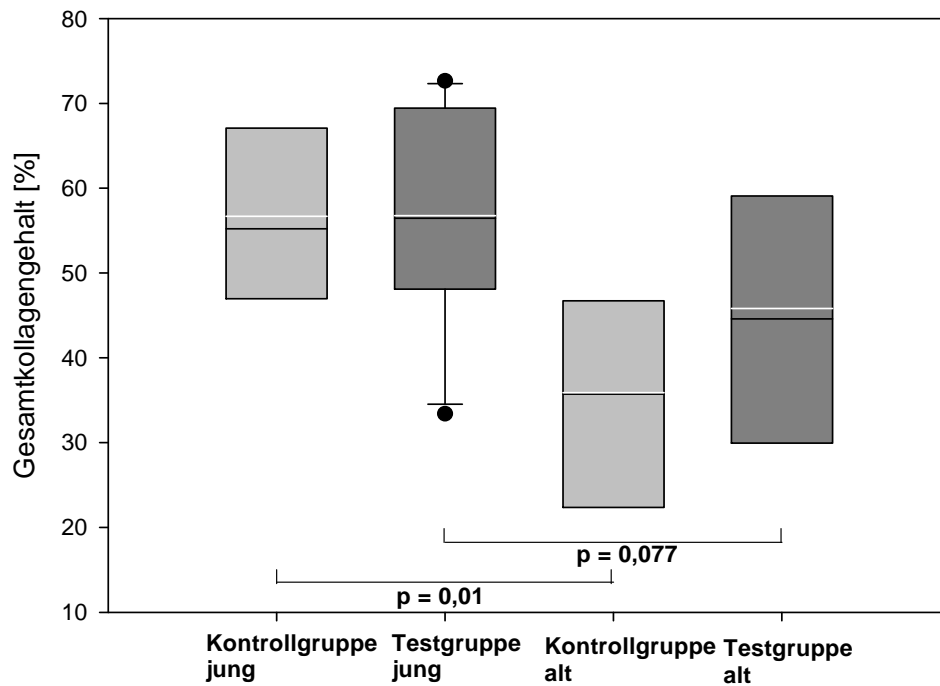


Abb. 41: Gesamtkollagengehalt der jungen und alten Kontroll- und Testgruppen im Vergleich. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert.

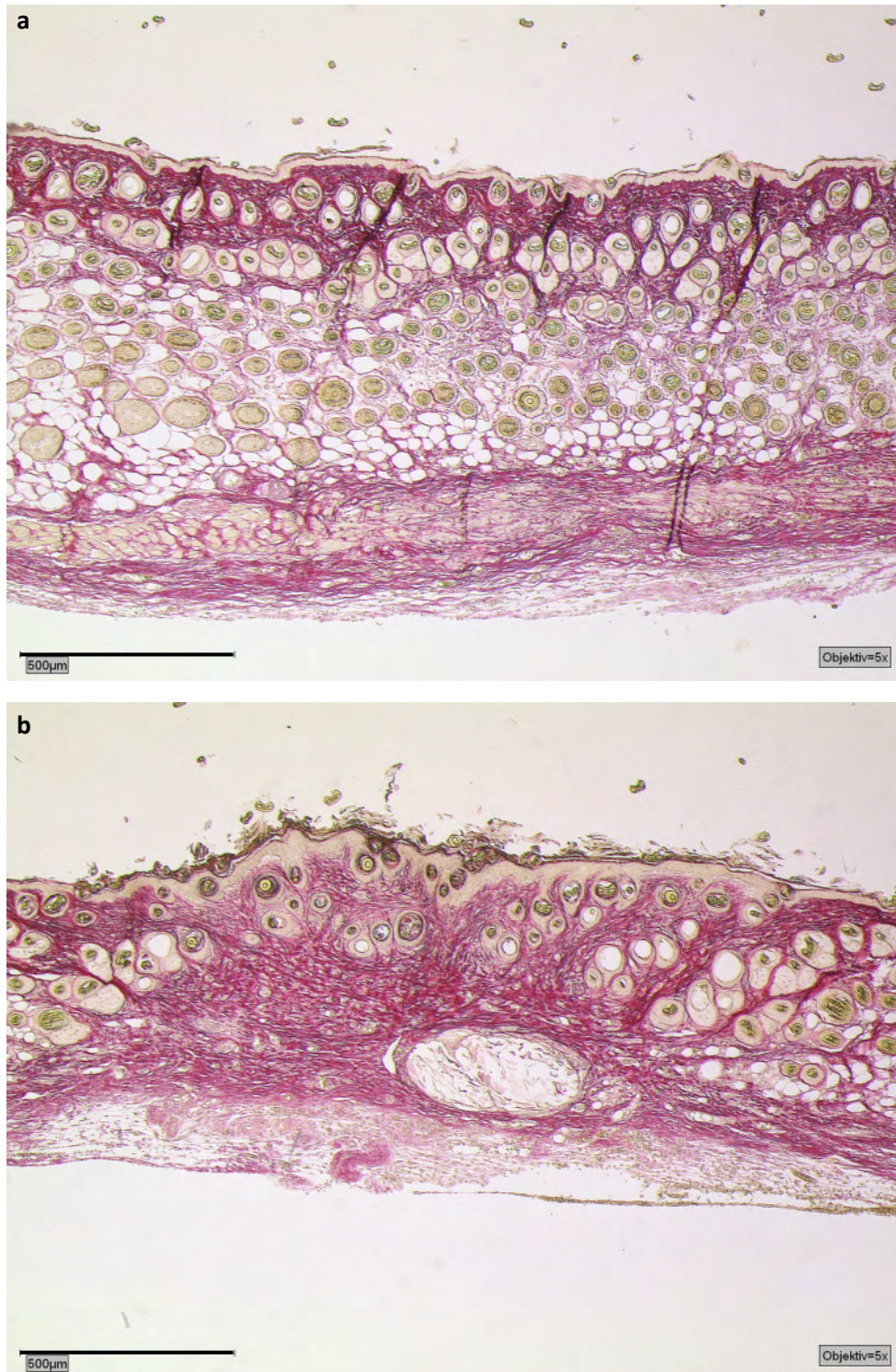


Abb. 42: Die Abbildung zeigt exemplarisch zwei Wunden aus der Alttiergruppe (B-WI-39; **a**; B-WI-71, **b**), der drei Tage nach Wundverschluss entnommenen Proben, die sich in verschiedenen Heilungsstadien befinden. Bei beiden sind deutlich lockere, relativ dünne Kollagenfaserbündel zu erkennen. Pikrin-Sirius-Rot, Durchlicht; Objektivvergrößerung: 5x, Balken = 500µm. µm = Mikrometer

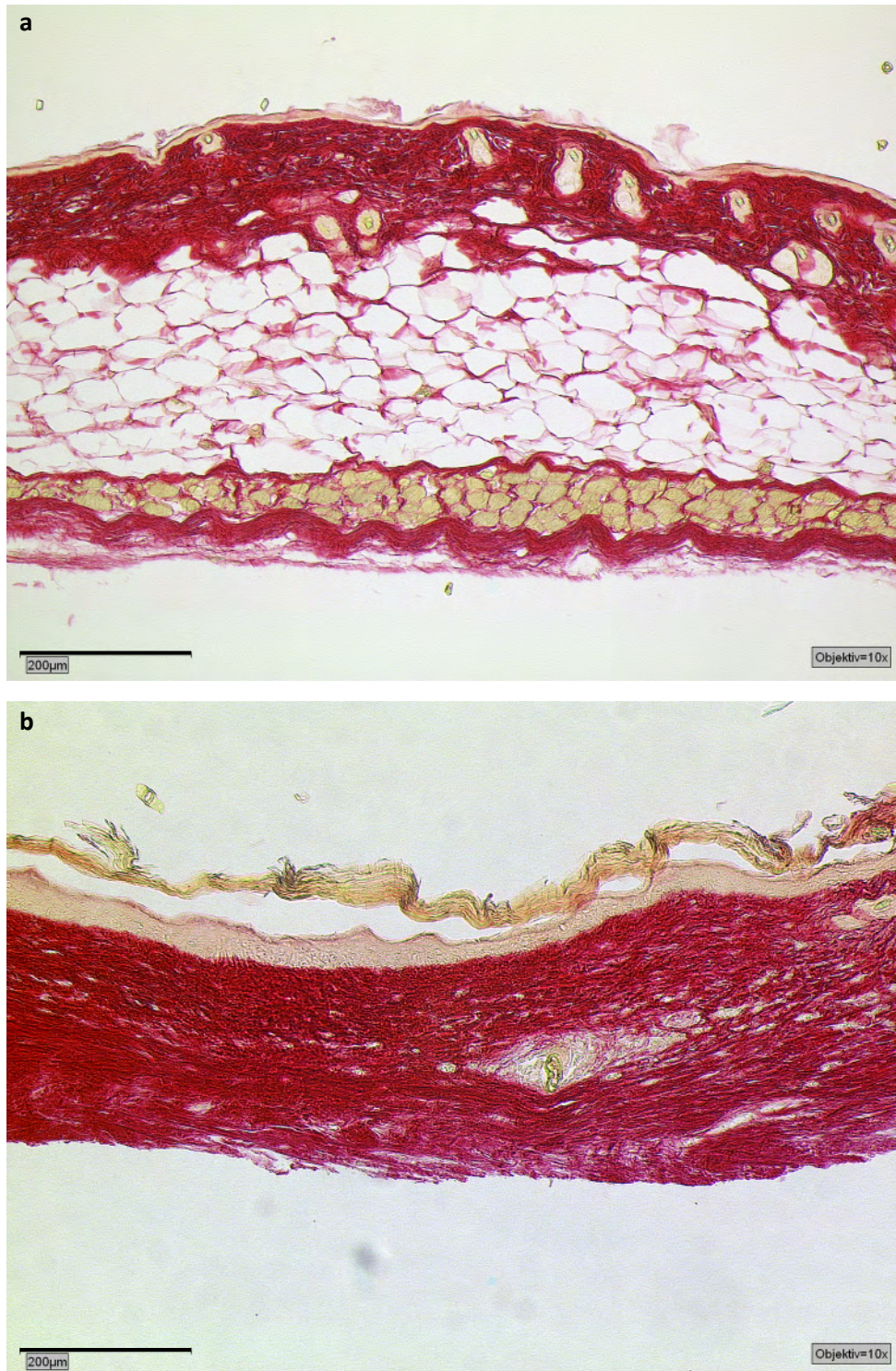


Abb. 43: Diese Abbildung zeigt zwei Beispiele aus der Alttiergruppe (B-WI-43, **a**; B-WI-67, **b**), die vier Wochen nach Wundverschluss entnommenen Proben. Hier ist eine deutlich dichtere Packung der Kollagenfaserbündel zu erkennen. Die einzelne Faser erscheint dicker. Pikrin-Sirius-Rot, Durchlicht; Objektivvergrößerung: 10x, Balken = 200µm. µm = Mikrometer

3.3.5 Gefäßdichte

Es bestehen signifikante Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen jungen und alten Tieren (Abb. 44).

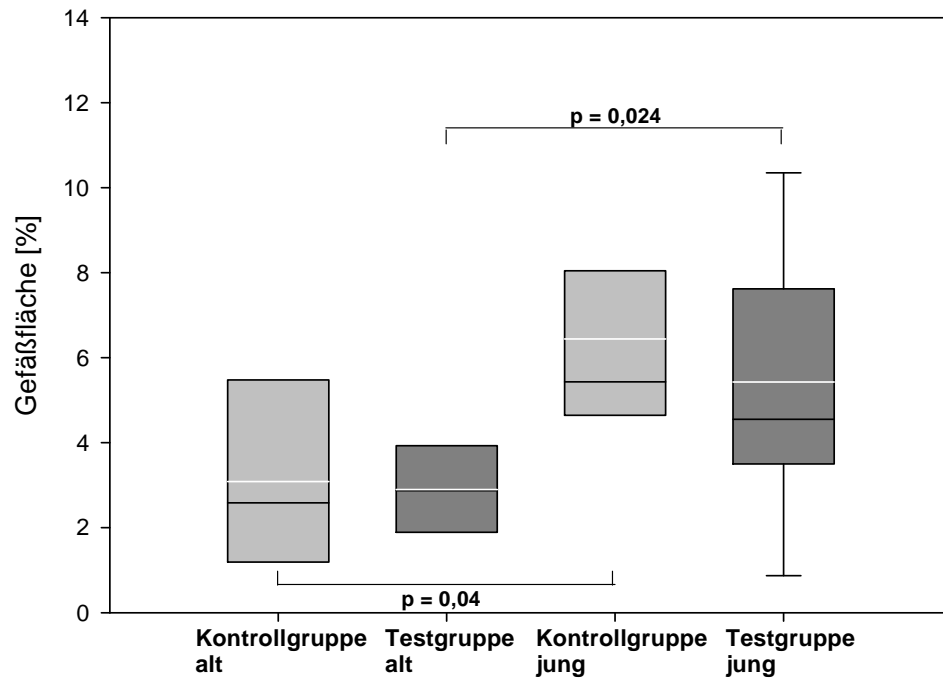


Abb. 44: Vergleich der prozentualen Gefäßfläche der jungen und alten Test- und Kontrollgruppen, die 3 Tage nach Wundverschluss entnommen wurden. Boxplot mit 25., 50. (schwarze Linie) und 75. Perzentilen, 10. und 90. Perzentilen (Whiskers), sowie 5. und 95. Perzentilen (Punkte). weiße Linie = Mittelwert.

4. Diskussion

Die kutane Wundheilung ist ein komplexer Ablauf von Prozessen, die in eine exsudative, proliferative und reparative Phase eingeteilt werden können. Chirurgisches Ziel jeder Therapie ist eine primäre Heilung unter Vermeidung von Wundheilungsstörungen. Eine Reihe von exogenen und endogenen Faktoren besitzen negative Auswirkungen auf den Wundheilungsverlauf. Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose und chronisch-venöse Insuffizienz können durch unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes infolge von Minderdurchblutung oder erhöhtem interstitiellen Druck die Wundheilung empfindlich stören. Des weiteren wirken sich Nikotin- oder Alkoholabusus sowie Mangelernährung negativ aus (Krüger und Wolfrum, 2007).

Auch in der Tiermedizin können Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Morbus Cushing den normalen Heilungsablauf stören. Einen weiteren Risikofaktor stellt die bakterielle Besiedelung der Wunde dar. Es besteht eine hohe Inzidenz für Bisswunden, die -bedingt durch die Keimflora des Gebisses und der Mundhöhle- meist primär kontaminiert sind (Hübler, 2009). Hinzu kommt die Problematik der sekundären Kontamination der Wunde durch Belecken oder Kratzen des Patienten im Wundareal. Die Gefahr der Wundinfektion wird zusätzlich begünstigt durch das Umfeld des Tieres, z. B. seine Unterbringung in Ställen oder Zwingern, die meist mit einem höheren Verschmutzungsgrad durch Einstreu, Staub oder Kot einhergehen (Otten, 2005). Der Kontakt mit Artgenossen kann hierbei auch ein Problem darstellen.

Die chronische Wunde stellt in der Humanmedizin ein großes volkswirtschaftliches Problem dar, weswegen die Entwicklung innovativer Therapiekonzepte an Bedeutung zunimmt. Neben der topischen Applikation von Wachstumsfaktoren ist auch der Gen-Transfer ein vielversprechender Ansatz, bei dem durch gezieltes Einschleusen von Genen eine temporäre Manipulation der Proteinproduktion zur Verbesserung der Wundheilung führen soll (Harding et al., 2002; Branski et al., 2006).

Daneben konnten physikalische Therapien wie die V.A.C.®-Therapie Erfolge nachweisen (Vacuum Assisted Closure™, KCI, San Antonio, Texas; DeFranzo et al., 2001; Jacobs et al., 2008). Ein subatmosphärischer Druck, der auf der Wunde erzeugt wird, vermindert Wundödeme durch Entfernung der Wundgewebeflüssigkeit, verbessert die Durchblutung und bewirkt durch mikromechanische Kräfte, die auf das Cytoskelett der Zellen einwirken, eine Erhöhung der Zellproliferation und damit der Granulationsgewebebildung (Morykwas et al., 1997; Pietramaggiore et al., 2007). Die grundlegende Bedeutung mikromechanischer Kräfte für die Aufrechterhaltung der Form und Regulation von Geweben sind schon länger bekannt (Ingber, 1991). Sogar eher einfache Verfahren wie eine Vitamin-C-Applikation haben nachweislich einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess (Rümelin et al., 2005; persönliche Mitteilung M.A. Konerding, 2009).

Eine weitere physikalische Behandlungsmodalität stellt die Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A dar. Sie bewirkt durch den hohen Energieeintrag kombiniert mit einer geringen thermischen Belastung der Hautoberfläche eine Steigerung der Gewebetemperatur sowie der Durchblutung und könnte so das Wundmilieu verbessern und eine Heilung fördern (Hellige et al., 1995; Vaupel und Stofft, 1995; Hartel et al., 2006).

Nach einigen Arbeiten, die positive Effekte des wIRA auf die Wundheilung am Menschen beschreiben konnten (Hartel et al., 2006; von Felbert et al., 2007; Hartel et al., 2007; Mercer et al., 2008), war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die möglichen Effekte der wIRA-Bestrahlung in einem etablierten Mausdefektwundenmodell zu erfassen und eine Struktur-Funktions-Korrelation zu erstellen.

4.1 Tier- und Wundmodell

Wir wählten für unseren Versuch ein Defektwundmodell in der Maus. Das murine Modell ist kostengünstig und die Maus als Versuchstier ist leicht handhabbar und

unkompliziert in der Haltung. Durch die Ähnlichkeiten in der Wundheilung zwischen Mensch und Maus werden Untersuchungen im murinen Modell als auf den Menschen übertragbar angesehen (Salcido et al., 2007). Davidson (1998) schreibt den Tiermodellen zwar eine generelle Übertragbarkeit in Bezug auf Heilungsstörungen wie Dehiszenz, Ischämie, Ulzeration, Infektion und Narbenbildung zu, weist aber gleichzeitig darauf hin, dass sie wegen der erheblichen Unterschiede im Hautaufbau und der Immunantwort nie eine Überprüfung beim Menschen ersetzen können.

Mäuse besitzen eine dichte Haardecke, eine relativ dünne epidermale und dermale Schicht und werden als „loose-skinned“ angesehen (Perez und Davis, 2008). Ihre Haut ist verschieblich und nur locker mit dem darunter liegenden Gewebe verankert (Grinnell, 1994). Sie besitzen außerdem einen Hautmuskel, den *Panniculus carnosus* (Hayward und Robson, 1991). Im Gegensatz dazu zählen der Mensch und auch das Schwein zu den sogenannten „tight-skinned“ Spezies, deren Haut fest an dem Unterhautgewebe adaptiert ist (Hayward und Robson, 1991; Grinnell, 1994). Nager, wie die Maus oder das Meerschweinchen, erzielen durch ihre lockere Haut den Wundverschluss zu 90% durch Kontraktion; der Mensch hingegen nur zu 21-25% (Catty, 1965). Die Hauptmechanismen des Wundschlusses beim Menschen sind dagegen die Granulationsgewebebildung und Reepithelisierung (Galiano et al., 2004).

Allerdings ist der Beitrag des *Panniculus carnosus* zum Prozess der Wundkontraktion umstritten. Einerseits wird erst durch die fehlende Adaptation in der Tiefe der maximale Effekt der Wundkontraktion der „loose-skinned“ Tiere möglich (Peacock, 1984), andererseits kann der Hautmuskel durch widerstandslose Kontraktion auch zur aktiven Ausweitung der Wunde beitragen (Hayward und Robson, 1991). Billingham und Russell (1956) zeigten, dass sich eine Hautwunde mit intaktem *Panniculus carnosus* über diesem bewegt und ihn als fixe Basis benutzt, der Muskel selbst bewegt sich beim Vorgang der Kontraktion nicht.

Unsere Versuche zeigen allerdings, dass der Beitrag der Kontraktion zur Wundheilung geringer war als angenommen und sich einige Wunden nach der Operation in ihrer Fläche sogar vergrößerten.

Der Hauptunterschied in der Wundheilung zwischen Mensch und Maus besteht darin, dass der Mensch bei einer Defektwunde nicht zu einer *restitutio ad integrum* befähigt ist. Es entsteht eine Narbe ohne Hautanhangsgebilde. Bei der murinen Heilung entsteht im Gegensatz dazu sogar eine Hypertrichose.

Als weiterer negativer Einflussfaktor auf den Verlauf der Wundheilung wird in der Literatur neben Erkrankungen wie Diabetes mellitus, dem Ernährungszustand oder einer Infektion auch häufig das Alter des Patienten genannt (Asmussen und Söllner, 1995; Enoch und Price, 2004; Thiede und Debus, 2006; Krüger und Wolfrum, 2007). Verschiedene tierexperimentelle Studien kommen zu dem Ergebnis, dass sich die Wunden junger Tiere schneller kontrahieren und daher auch über kürzere Verschlusszeiten verfügen (Goodson und Hunt, 1979; Billingham und Russell, 1956; Cuthbertson, 1959).

Als Modell für eine verzögerte Wundheilung entschieden wir uns für alte Tiere, da bei der Streptozotocin-Diabetesinduktion bis zu 25% Letalitäten (persönliche Mitteilung M.A. Konerding, 2009) entstehen und ein weiteres Viertel nicht anspricht. Knock-out Mäuse wie die db/db Maus sind zwar homogen, aber mit erheblichen Kosten verbunden. In der vorliegenden Studie werden neben einer Jungtiergruppe eine Gruppe von ex-breeder-Mäusen, die mit ihrem Alter von 20 - 21 Monaten die mittlere Lebensspanne deutlich überschritten hatten, gewählt. Les (1969) gibt eine mittlere Lebensdauer von 14,2 Monaten an, während Festing und Blackmore (1971) 18,7 Monate anführen. Die Hypothese unserer Arbeit ist, dass bei den älteren Tieren eine deutlichere Ausprägung möglicher positiver therapeutischer Effekte der wIRA-Bestrahlung auf die Wundheilung auftritt.

Als Modell für eine chronische Wunde werden Vollhautstanzwunden gewählt. Hierbei wird das Gewebe durch alle Hautschichten bis zur Faszie exzidiert. Der Vorteil dieses Modells liegt in der Größe des Wundareals. Durch die sekundäre Wundheilung bildet sich ausreichend Granulationsgewebe und Epithel, ausgehend von den Wundrändern, die für die histologische Auswertung genutzt werden können (Davidson, 1998). Im Gegensatz zur Inzisionswunde ist bei der Defektwunde eine Erfassung des Verlaufs der Wundverschlusszeiten möglich. Die Inzisionswunde

bietet zudem vergleichsweise wenig Material zur biochemischen und histologischen Untersuchung, da durch Adaptation der Wundränder nur wenig Granulationsgewebe und neues Epithel entstehen (Davidson, 1998). Diese Wundart eignet sich hingegen ideal zur biomechanischen Analyse (Davidson, 1998).

4.2 Bestrahlungsparameter

In dieser Studie wird mit einer Bestrahlungsstärke von 75 mW/cm^2 wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung bei täglich zwei Bestrahlungseinheiten zu je 10 min gearbeitet. Diese Werte liegen deutlich unter denen erfolgreicher Versuche in der Humanmedizin. Mercer et al. (2008) wählt eine Bestrahlungsstärke von 185 mW/cm^2 (140 mW/cm^2 wIRA + 45 mW/cm^2 VIS); Hoffmann (2007) gibt typische Bestrahlungsstärken zwischen 80 und 160 mW/cm^2 an, wobei sich in einigen Arbeiten nur Angaben über den Abstand zwischen Strahler und Patient sowie die Bestrahlungsdauer und Häufigkeit finden (Hartel et al., 2006; 2007).

Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass das Ausbleiben positiver Ergebnisse in unseren Versuchen eine Folge zu geringer Strahlendosis ist. Unsere Vorversuche haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Strahlungsstärke wie auch der Bestrahlungsdauer aufgrund der auftretenden Nebenwirkungen (starke Erhöhung der Körperkern- und Hauttemperaturen, Korneatrübungen) nicht akzeptabel ist. Eine Verlängerung der Bestrahlungsdauer würde auch durch die Versuchstiere schlecht toleriert werden, die gegen Ende der zehnminütigen Bestrahlung zum Teil Unruhe und Fluchtversuche zeigten.

Danno et al. (2001) befassen sich mit Infrarot-A-Strahlung ohne Wasserfilterung und können auch bei kleineren Dosen von 30 mW/cm^2 einmal täglich für 30 min eine signifikant verbesserte Wundheilung in db/db knock-out und ICR (imprinting control region) Mäusen im Gegensatz zu den scheinbestrahlten Tieren feststellen. Rezende et al. (2007) erreichen mit einer einmaligen postoperativen Bestrahlung mit

einem 830 nm Infrarotlaser der Intensität von 53 mW/cm² für 25 Sekunden eine schnellere Wundheilung, Reepithelisierung und verbesserte Kollagenorganisation. Andererseits könnte auch der Hitzestress der bestrahlten Tiere ein Grund dafür sein, dass wir keine verbesserte Wundheilung nachweisen können. Im Gegenteil, die bestrahlten Wunden heilen jeweils tendenziell langsamer ab, als die der Kontrollgruppe. Daraus könnte geschlossen werden, dass die Bestrahlungsstärke immer noch zu hoch gewesen ist.

Eine andere Möglichkeit die Erhitzung durch Ganzkörperbestrahlung zu umgehen, wäre die punktuelle Bestrahlung des Wundbereiches. Hierbei wäre es eventuell auch denkbar, die Dosis zu erhöhen. Allerdings ist eine solche punktuelle Bestrahlung nur unter Narkose möglich, die zweimal täglich durchgeführt werden müsste. Die negativen, belastenden Effekte auf den Organismus wären dabei zu erheblich und könnten sich ebenfalls nachteilig auf den Heilungsprozess auswirken.

Die hohe primäre Eindringtiefe der Infrarot-A-Strahlung von bis zu 2,5 cm (Cobarg, 1995), die bei der Behandlung des Menschen positiv und erwünscht ist, kann sich bei dem Versuchstier Maus ungünstig auswirken. Da die Maus eine relativ geringe Körpermasse aufweist, besteht die Gefahr der Hyperthermie. Das Hausschwein wäre aufgrund dieser Überlegungen als Versuchstier wahrscheinlich besser geeignet. Neben der größeren Körpermasse ist es dem Menschen außerdem im Hautaufbau ähnlicher. Die spärlich behaarte Epidermis mit einer Dicke von 30-140 µm ist ähnlich dick wie die des Menschen mit 50-120 µm (Meyer et al., 1978). Durch die unterschiedlichen Epidermisdicken an verschiedenen Körperstellen ist das Epidermis-Dermis-Verhältnis allerdings aussagekräftiger. Es beträgt beim Schwein ähnlich wie beim Menschen 10:1 bis 13:1 (Rose et al., 1977). Beide zeigen ausgeprägte Papillarkörper in der Dermis, wobei die des Menschen besser durchblutet sind als die des Schweines (Montagna und Yun, 1964). Die Dermis ist bei beiden reich an elastischen Fasern (Montagna und Yun, 1964). Das Schwein besitzt zwar auch einen *Panniculus carnosus* ist aber durch seine starke Verbindung zwischen Hautmuskel und Dermis bzw. tiefer Faszie besser vergleichbar mit dem Menschen, der bis auf das Platysma, ein Rudiment des *Panniculus carnosus*, keinen Hautmuskel mehr besitzt (Rose et al., 1977; Melis et al., 2002). Es zeigt nur im geringen Maße das Phänomen der Wundkontraktion (Sullivan et al., 2001). Die

Größe ermöglicht pro Tier mehrere Wunden zu setzen und diese jeweils zu bestrahlen oder scheinzubestrahlen.

4.3 Wundverschlusszeiten unter wIRA

Weder bei den Jung- noch bei den Alttieren wird in der Behandlungsgruppe eine verbesserte Heilung festgestellt. Tendenziell zeigen die Kontrolltiere sogar schnellere Verschlusszeiten. Ebenfalls entgegen unserer Erwartungen heilen die Wunden der alten Versuchstiere schneller als die jungen. Zu vermuten ist allerdings, dass dieser Unterschied durch den Effekt der sorgfältigeren Wundhygiene der alten Tiere hervorgerufen wurde. Diese haben sich von Beginn an den überstehenden Wundschorf entfernt und so eine exaktere Wundflächenmessung möglich gemacht. Im Gegensatz dazu sind die Wunden der jungen Tiere durch den überstehenden Schorf eher mit der Tendenz zu größeren Wundflächen gemessen worden. Aus diesem Grund wurde an Tag 9 ein Schorfdébridement vorgenommen. In den folgenden Messungen bestand danach keine Signifikanz zwischen jung und alt. Abbildung 45 zeigt exemplarisch die Schorfruste eines jungen und eines alten Tieres im Vergleich.

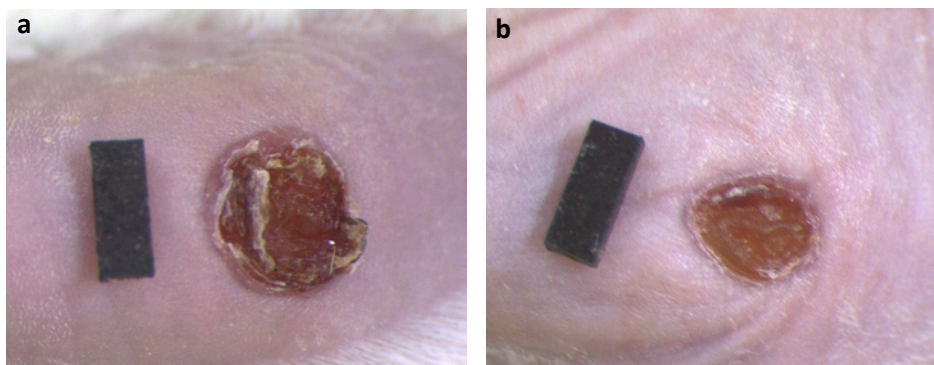


Abb. 45: Wundsituation eines jungen Testtieres (a) und eines alten Testtieres (b) an Tag 9 post OP. Das junge Tier zeigt eine deutlich ausgeprägtere Schorfruste als das alte Tier, das eine sorgfältigere Wundhygiene betrieb.

Unsere eigentliche Hypothese, dass sich in einer Gruppe von alten Tieren mit verzögerter Wundheilung die möglichen therapeutischen Effekte der wIRA Bestrahlung

deutlicher manifestieren, muss also verworfen werden. In der Literatur existieren unterschiedliche Ansichten über den Einfluss des Alters auf die Wundheilung. Die ersten Dokumentationen über eine Beeinträchtigung der Wundheilung im Alter erfolgten Anfang des letzten Jahrhunderts durch einen Militärarzt, der die Heilung offener Wunden über einen Vernarbungsindex charakterisierte und diesen dann mit dem Alter korrelierte (Du Noüy, 1916). Neben Arbeiten, die bei jungen Tieren nach Inzisionswunden eine bessere Wundkontraktion und kürzere Verschlusszeiten nachweisen (Billingham und Russell, 1956; Cuthbertson, 1959), erwidern andere, dass eine schlechte Wundheilung im Alter per se nicht ausreichend bestätigt ist (Ashcroft et al, 1995). Es gibt im Gegenteil sogar Berichte über eine gesteigerte Heilungsgeschwindigkeit alter Mäuse (Cohen, 1987).

Im Alter vollziehen sich verschiedene Veränderungen im Wundheilungsprozess. Die Ausschüttung elektronendichter Granula der Thrombozyten, bemessen an der Serotoninausschüttung nach Kollagen- oder Thrombinstimulation, steigt bei mittelalten und alten Ratten an (Yonezawa et al., 1989). Die Entzündung ist gekennzeichnet durch verspätete Einwanderung der Entzündungszellen wie Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, die im Anschluss aber höhere Maximalwerte erreichen. Swift et al. (2001) zählen am ersten Tag nach Wundsetzung 56% mehr Makrophagen bei den alten Mäusen, bei den T-Lymphozyten sind es an Tag 14 74%, sieben Tage später sogar 154% mehr als bei den jungen Tieren (Swift et al., 2001). Die hohe Makrophagenzahl versucht man mit einer Abnahme in ihrer Funktion zu erklären. Swift et al. (2001) können nachweisen, dass bei alten Mäusen nicht nur der Prozentsatz an phagozytierenden Makrophagen abnimmt, sondern auch die Anzahl der von jeder Zelle phagozytierten Partikel. Obwohl die meisten Chemokine im Alter unverändert oder vermindert produziert werden, ist der MCP-1 Gehalt (monocyte chemoattractant protein-1) erhöht, was die erhöhten Makrophagenzahlen erklärt (Swift et al., 2001).

Die Phase der Proliferation ist im Alter gekennzeichnet durch verspätete Reepithelisierung, Kollagensynthese und Angiogenese (Swift et al., 1999). Plisko und Gilchrest (1983) weisen in vitro bei Fibroblasten Erwachsener im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Neugeborener ein schlechteres Wachstum und eine schlechtere Antwort auf Wachstumsfaktoren nach und schließen so auf eine verminderte

Aktivität alter Fibroblasten. Holm-Pedersen et al. (1974) stellen in ihren Untersuchungen dagegen zwar einen verpäteten Fibroblastenpeak fest, der sich lange nicht abbaut, aber gleiche Mengen wie bei jungen Mäusen.

Die Veränderungen im Wundheilungsablauf können eine Verzögerung der Heilung bewirken, haben aber keinen Einfluss auf die Narbenqualität (Ashcroft und Horan, 1997; Gosain und DiPietro, 2004). Brem und Tomic-Canic (2007), Quirina und Viidik (1991) und Van de Kerkhof et al. (1994) stellen eine Verzögerung der Wundheilung im Alter nur in Kombination mit einer Begleiterkrankung fest.

Da die untersuchten alten Mäuse keine verzögerte Wundheilung zeigen, liegt es nahe, die Versuche an einem anderen Modell verzögerter Wundheilung zu prüfen. In der Literatur findet man verschiedene Formen der verzögerten Wundheilung. Es besteht die Möglichkeit der Diabetes-mellitus-Induktion durch Injektion von Streptozotocin, einem Antibiotikum, das zytotoxisch auf die β -Zellen des endokrinen Pankreas wirkt (Davidson, 1998). Daneben bestehen auch Ratten- und Mauslinien mit genetisch manifestiertem Diabetes (Davidson, 1998; Keswani et al., 2004). Mangelernährung wie Vitamin A oder Zink-Mangel bei der Ratte sowie Vitamin C Mangel beim Meerschweinchen gehören zu den frühesten Modellen der verzögerten Wundheilung (Davidson, 1998). Glucocorticoide haben einen entzündungshemmenden Effekt, reduzieren die Hautdicke und hemmen die Wundheilung. Monozyten verlieren ihre Fähigkeit, sich in Makrophagen zu differenzieren und Fibroblasten produzieren weniger Kollagen. Man kann kurzwirksames Hydrocortison oder Dexamethason und langwirksames Methylprednisolon verabreichen (Davidson, 1998).

4.4 Mechanische Belastbarkeit nach wIRA

Ein repräsentativer Parameter zur Überprüfung der Wundheilungsqualität ist die biomechanische Belastbarkeit des Narbengewebes (Holm-Pedersen und Viidik, 1972; Campos et al., 2008). Um diese zu untersuchen, wird in der vorliegenden Arbeit drei Tage bzw. vier Wochen nach Wundverschluss eine Zerreißprobe durchgeführt. Zusätzlich wird im Rahmen der histologischen Analysen der

prozentuale Gesamtkollagengehalt anhand der Picro-Sirius-Rot-Färbung im Durchlicht ermittelt.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit des Narbengewebes zwischen Test- und Kontrollgruppen. Allerdings liegen die Zug-Dehnungswerte der alten Mäuse in Kontroll- und Testgruppe signifikant über denen der Jungtiergruppe. Trotzdem weisen die geheilten Wundareale der jungen Tiere höhere Gesamtkollagengehalte auf, die -bezogen auf die Kontrollgruppe- sogar signifikant sind. Daraus ist zu schließen, dass nicht der Kollagengehalt an sich, sondern vielmehr die Quervernetzung für die mechanische Belastbarkeit ausschlaggebend ist. Der prozentuale Kollagengehalt der Test- und Kontrollgruppenwunden unterscheidet sich wiederum nicht signifikant.

Studien über die mechanische Belastbarkeit von Narbengewebe alter Tiere kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Beck et al. (1993) eine bis zu 27% geringere Reißfestigkeit des Gewebes alter Ratten nach Inzisionswunden im Vergleich zu jungen feststellen, erreichen Inzisionswunden alter Mäuse bei Ershler et al. (1984) schneller höhere Reißfestigkeiten als die der Jungtiere. Allerdings liegen die Zug-Dehnungswerte unverletzter Haut junger Tiere auch deutlich über denen der alten Tiere. Holm-Pedersen und Zederfeldt (1971) ermitteln an den Tagen 4 und 21 nach Wundsetzung (Inzisionswunde) bessere Zug-Dehnungswerte für junge Ratten und stellen an Tagen 7 und 14 keinen Unterschied zwischen jung und alt fest. Leaming (1963) beschreibt bei Mäusen nach Inzisionswunden steigende Zug-Dehnungswerte mit zunehmendem Alter und vermutet einen Zusammenhang mit der höheren Hautdicke, die er bei den alten Tieren feststellt. Quirina und Viidik (1991) zeigen in ihrer Studie, dass eine normale Inzisionswunde bei alten Ratten nach mechanischen Gesichtspunkten genauso gut heilt wie bei jungen abgesehen von einer erhöhten Steifheit. Nur die ischämischen Wunden alter Tiere heilen mit einer 40-65%igen Verschlechterung der mechanischen Belastbarkeit. Daraus folgern sie, dass Ischämie den alten Organismus deutlich mehr belastet und so negative Auswirkungen auf die Wundheilung hat.

Alte Mäuse zeigen eine verspätete Kollagensynthese (Swift et al., 1999). Bei Quirina und Viidik (1991) übersteigt der Wundkollagengehalt alter Ratten den

junger. Ashcroft et al. (1997) stellen trotz einer allgemeinen Abnahme an Kollagen Typ I und II eine normale korbgeflechtartige Kollagenstruktur in den Wunden alter Mäuse fest und dagegen eine abnormal dichte Narbenstruktur bei den jungen Tieren. Dies könnte auch in unserer Arbeit der Grund für die bessere mechanische Qualität der Narben alter Tiere sein, trotz ihres geringeren Kollagengehaltes.

Bezüglich der Gesamtschichtdicke zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppen junger und alter Versuchstiere. Allerdings ermitteln wir im Mittel eine signifikant höhere Gesamtschichtdicke für die alten Tiere, die drei Tage nach Wundverschluss entnommen werden, im Vergleich zur Jungtiergruppe. Dies widerspricht der Annahme, dass sich bei besserem Heilungsfortschritt die Gesamtschichtdicke verringert. Die alten Tiere, deren Schichtdicken vier Wochen nach Wundverschluss ermittelt werden, zeigen dann aber eine signifikante Verringerung im Vergleich zu den früh entnommenen Proben und gegenüber der Jungtiergruppe. Eventuell ist die Abnahme der Gewebeschichtdicke ein Parameter, der erst im fortgeschrittenem Heilungsstadium zum tragen kommt.

4.5 Wundmonitorierung mittels Infrarotthermographie

Um die Effekte der wIRA Bestrahlung unmittelbar überprüfen zu können, bietet sich die Infrarotthermographie an. Sie stellt ein System dar, das die infrarote Strahlung eines Körpers erfasst. Jedes Objekt emittiert, abhängig von seiner Temperatur, eine charakteristische infrarote Strahlung, die in Form von Photonen ausgesendet wird (Karstberger und Stachl, 2003). Die Infrarotkamera nimmt diese auf und wandelt sie über einen integrierten Detektor in elektrische Signale um, die dann als Temperaturwerte dargestellt werden (Karstberger und Stachl, 2003).

Diese Technologie findet in der Veterinärmedizin vor allem zur unterstützenden Diagnostik von Lahmheiten beim Pferd Anwendung (Turner et al., 1983; Turner, 1991; Weil et al., 1998; Eddy et al., 2001; Turner, 2001;). Fonseca et al. (2006) diagnostizieren mit einer Kombination von Infrarotthermographie und Ultraschall erfolgreich thorakolumbale Erkrankungen beim Pferd. Aber auch

zur Identifikation von Injektionen (Van Hoogmoed und Snyder, 2002), zur Bewertung von Herdengesundheit und Haltungssystemen durch Untersuchung des thermisch-physiologischen Wohlbefindens der Tiere (Röhlinger et al., 1980; Dauncey und Ingram, 1983; Warriss et al., 2006; Steward et al., 2007; Rainwater-Lovett et al., 2009) oder zur Diagnosehilfe und Trächtigkeitskontrolle bei Zootieren (Hilsberg, 1998; Boldstar, 2003; Karstberger und Stachl, 2003; Durrant et al., 2006) wird die Infrarotthermographie eingesetzt.

Durch Ermittlung der oberflächlichen Temperaturverteilung der Haut lässt sich direkt auf die darunter stattfindenden Prozesse rückschließen. Die Temperatur spiegelt den Gewebestoffwechsel und die Durchblutung wider und gibt so bei veränderten Temperaturmustern Hinweise auf zugrunde liegende pathologische Prozesse wie zum Beispiel Entzündungen (Purohit und McCoy, 1980; Van Hoogmoed und Snyder, 2002; Colak et al., 2008).

Die Infrarotthermographie soll uns Aufschluss über die wIRA-induzierte Temperaturerhöhung im Zeitverlauf geben. Regulatorische Durchblutungssteigerungen oder Perfusionserhöhung durch Gefäßneubildung können ebenfalls sequentiell erfasst werden.

Die Angiogenese und Perfusion sind Voraussetzung für eine adäquate Wundheilung. Schlecht heilenden und chronischen Wunden liegt häufig ein hypoxisches Wundgebiet zugrunde. Aber auch jede normale Wunde ist durch die Kontinuitätsunterbrechung des Gewebes und der Gefäße sowie durch die ablaufende Kaskade der Blutstillung zumindest zeitweise hypoxisch. Der Sauerstoffpartialdruck einer Hautwunde rangiert von 0-10 mmHg im hypoxischen Zentrum und bis zu 60 mmHg in der Peripherie an der Grenze zur unverletzten Haut (Gordillo und Sen, 2003).

Eine mögliche Steigerung der Gefäßneubildung durch die wIRA-Bestrahlung wird außerdem durch die Markierung der Endothelien mit einem gegen CD31 gerichteten Antikörper überprüft. Der CD31-Antikörper ist monoklonal und bindet spezifisch an Membranproteine (PECAM-1), die auf Endothelzellen und in geringerer Konzentration auch auf Thrombozyten, Monozyten und T-Zellen exprimiert werden. Eine Faktor VIII-Färbung, die Gefäße durch die Markierung des von Willebrand Faktors

in den Endothelzellen visualisiert, unterschätzt in murinen Geweben die Gefäßdichten, da besonders in den Kapillaren erheblich weniger bis gar keine Weibel-Palade-Körperchen vorhanden sind (Hammersen et al., 1983).

Neben einer relativ kurz andauernden Erwärmung der Wunde und der umgebenden Haut können wir in der vorliegenden Arbeit keine lang anhaltenden Effekte der wIRA Bestrahlung im Sinne eines dauerhaften Wundtemperaturanstieges und einer Mehrdurchblutung nachweisen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Gefäßdichte wider. Auch hier werden keine signifikanten Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppen festgestellt. Die Jungtiere zeigen allerdings signifikant größere prozentuale Gefäßoberflächen in den geheilten Wunden als die Alttiergruppe. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Rivard et al. (1999) und Swift et al. (1999) überein, die eine reduzierte Angiogenese im Alter feststellen. Hierfür könnten verminderte Mengen an angiogenen Faktoren wie FGF, VEGF und TGF- β verantwortlich sein (Reed et al., 1998; Rivard et al., 1999; Swift et al., 1999;). Dafür spricht, dass die Substitution von Wachstumsfaktoren die Beeinträchtigung der Angiogenese alter Mäuse verbessert (Arthur et al., 1998). Auch Yamaura und Matsuzawa (1980) zeigen, dass das Einwachsen von Kapillaren ins Wundgebiet bei alten Ratten verspätet stattfindet. Ashcroft et al. (1997) weisen hingegen in ihren Untersuchungen eine erhöhte Anzahl an Gefäßen bei alten Mäusen nach.

Der Grund für die höhere Gefäßdichte der Jungtiere könnte darin liegen, dass sich die Wunden der Jungtiere zum großen Teil noch im Stadium der Granulation befinden, das durch eine besonders hohe Anzahl an Gefäßen gekennzeichnet ist. Die Alttiere hingegen sind in ihrer Heilung weiter fortgeschritten und zeigen überwiegend wieder korrekt geschichtetes Gewebe, was auch mit einer Remodelierung neugebildeter Gefäßnetzwerke einhergeht.

4.6 Schlussfolgerung

Die hier vorliegende Arbeit ist weder geeignet einen positiven Nutzen der wIRA Bestrahlung auf die Wundheilung zu belegen noch auszuschließen. Das Ausbleiben positiver Ergebnisse unter Berücksichtigung der vorliegenden Literatur legt nahe, den Einfluss der wIRA-Bestrahlung auf die Wundheilung erneut an einem anderen Versuchstier zu überprüfen. Die Maus hat sich aufgrund ihrer Hyperthermiegefährdung durch ihre geringe Körpermasse als ungeeignet herausgestellt. Das Schwein würde sich aufgrund seiner Größe und Ähnlichkeit im Hautaufbau anbieten. Eine weitere Möglichkeit wäre eine prospektive, randomisierte Doppelblindstudie mit einem Probandenkollektiv, dem definierte Wunden zugefügt werden.

5. Zusammenfassung

Wichtige Grundlage für den ungestörten Ablauf der Wundheilung ist neben dem komplexen Zusammenspiel von Faktoren und biochemischen Prozessen die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff. Letzterer spielt eine essentielle Rolle sowohl in der Infektabwehr durch Granulozyten als auch in der Kollagenproduktion. Untersuchungen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass durch wIRA-Bestrahlung neben der Gewebetemperatur und damit dem Stoffwechsel auch die Durchblutung und der Sauerstoffpartialdruck gesteigert werden konnte. So konnten beim Menschen einige Arbeiten positive Effekte der wIRA-Bestrahlung auf die Heilung akuter und chronischer Wunden beschreiben. Auffällig ist jedoch, dass diese ganz überwiegend in Zeitschriften mit geringem wissenschaftlichen Impakt und Akzeptanz sowie in Buchbeiträgen veröffentlicht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse an einem etablierten Defektwundmodell in der jungen und alten Maus untersucht.

Ein direkter Effekt der Bestrahlung wie Hauttemperaturerhöhung wurde mittels Infrarotthermographie ermittelt. Therapeutische Einflüsse wurden histologisch durch Bewertung charakteristischer Wundheilungsparameter wie Gesamtschichtdicke, Kollagengehalt und prozentuale Gefäßfläche geprüft. Der Therapieerfolg im Sinne einer erhöhten Funktionalität des Narbengewebes wurde mit einer Zug-Dehnungs-Zerreißprobe quantifiziert.

Nach der Bestrahlung mit wIRA steigen die Wundtemperaturen der jungen Tiere zwischen 1,02-2,73°C, die der alten Tiere zwischen 1,03-1,82°C an. Die Erwärmung des Gewebes ist nur von kurzer Dauer und nach durchschnittlich 15 Minuten ist wieder die Ausgangstemperatur erreicht. Auch in den folgenden Messungen können keine lang anhaltenden Bestrahlungseffekte anhand der Infrarotthermographie festgestellt werden.

Sowohl junge als auch alte Mäuse zeigen keine schnelleren Wundverschlusszeiten unter wIRA. Während die jungen Testmäuse im Mittel nach 8 Tagen 50% Wundverschluss erreichen, benötigen die Kontrollen dafür nur 7,5 Tage. Die

Wunden der alten Tiere heilen entgegen unseren Erwartungen sogar schneller als bei den jungen Mäusen. Hier erreicht die Testgruppe im Mittel am Tag 6, die Kontrollgruppe am Tag 5,3 50% Wundverschluss.

Dieses Ergebnis spiegelt auch die Zug-Dehnungs-Zerreißprobe wider. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit des Narbengewebes zwischen jungen Test- und Kontrolltieren ($p = 0,279$). Mit der mechanischen Belastbarkeit von 1,121 N in der Kontrollgruppe und 1,025 N in der Testgruppe liegt die Reißfestigkeit am dritten Tag nach Wundverschluss bei 35-32% derer unverletzter Haut. In der Alttiergruppe besteht weder zum frühen (drei Tage nach Wundverschluss; $p = 0,091$) noch zum späten (vier Wochen nach Wundverschluss; $p = 0,132$) Entnahmezeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Reißfestigkeit des Narbengewebes von Test- und Kontrollgruppe. Jedoch existieren signifikante Unterschiede zwischen alten und jungen Test- und Kontrolltieren (Test: $p = 0,007$; Kontrolle: $p = 0,025$) zu Gunsten der alten Tiere.

Auch die Auswertung der histologischen Parameter ergibt keinen Hinweis auf einen therapeutischen Effekt der wIRA-Bestrahlung. Weder die Gesamtschichtdicken der Test- und Kontrollgruppe der Jungtiere ($p = 0,399$) noch die der Alttiere zum frühen ($p = 0,385$) oder späten Entnahmezeitpunkt ($p = 0,142$) zeigen signifikante Unterschiede.

Der durchschnittliche Kollagengehalt im Wundgebiet der jungen Testmäuse liegt mit 56,76% nahe dem der Kontrollen mit 56,67% ($p = 0,495$). In der Alttiergruppe erreicht die Testgruppe zum frühen Entnahmezeitpunkt mit 45,8% zwar höhere Durchschnittswerte als die Kontrollgruppe mit 35,89% aber es besteht keine Signifikanz ($p = 0,145$). Zum späten Entnahmezeitpunkt sind beide Behandlungsgruppen wieder gleichauf ($p = 0,471$).

Zwischen den ehemaligen Wundflächen der jungen Testtiere mit einer durchschnittlichen Gefäßfläche von 5,43% und denen der Kontrolltiere mit 6,44% besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p = 0,26$). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den alten Mäusen, deren scheinbehandelte Gruppe zum frühen (3,09%) und späten (6,6%) Entnahmezeitpunkt durchschnittlich höhere prozentuale Gefäßflächen

aufweisen als die korrespondierende Behandlungsgruppe (früh: 2,9%; spät: 4,73%). Allerdings sind die Unterschiede auch hier nicht signifikant (früh: $p = 0,451$; spät: $p = 0,095$). Das Gefäßaufkommen im Wundgewebe der jungen Test- und Kontrollgruppe ist jeweils signifikant höher als das der alten Test- und Kontrollgruppe (Test: $p = 0,024$; Kontrolle: $p = 0,04$).

6. Summary

Besides the complex interaction of factors and biochemical processes, a sufficient oxygen supply is the basis for the well regulated course of wound healing. It plays an important role concerning infection defence by granulocytes and in collagen production. Research has shown that wIRA irradiation enhances tissue temperature and metabolism and for this reason also intensifies blood flow and oxygen partial pressure. Some studies describe positive effects of wIRA irradiation on acute and chronic human wound healing. Nevertheless it is noticeable that these are predominantly published in journals with low impact and acceptance or as a book contribution. This thesis examined the effects of wIRA on a defined wound healing model in young and old mice.

Immediate effects of irradiation as tissue temperature were evaluated by infrared thermography. Therapeutic influences were analyzed by histologic wound healing parameters like tissue thickness, collagen content and percentual vessel area. Therapeutic success by means of high functional scar tissue got quantified with a tensiometer.

During wIRA irradiation wound temperatures of the young animals raise between 1,02-2,73°C, the ones of old animals between 1,03-1,82°C. The warming only lasts a short period of time and after 15 minutes the tissue returns to original temperatures. The following measurements also reveal no long lasting effects of wIRA irradiation.

Young as well as old mice show no faster wound healing under wIRA irradiation. Whereas young treated mice need a mean of 8 days to reach 50% wound closure, the controls only need 7,5 days. Contrary to our expectations the old animals healed faster than the young ones. Here treatment group reaches 50% wound closure at day 6, control group at day 5,3.

The tensile elongation test also reflects this result. There are no significant differences in tensile strength of scar tissue between young tests and controls ($p =$

0,279). Three days after complete wound closure the mean tensile strength of 1,025 N in the control group and 1,121 N in the test group achieves 35-32% of strength of uninjured skin. The group of old mice shows no significant difference in tensile strength of scar tissue between test- and control group neither at the early (three days after wound closure; $p = 0,091$) nor at the late date of explantation (four weeks after wound closure; $p = 0,132$). However there are significant differences between young and old test and control animals in favour of the old ones (test: $p = 0,007$; control: $p = 0,025$).

The evaluation of histologic parameters reveals no evidence for a therapeutic effect of wIRA irradiation as well. The tissue thickness of test- and control group of young animals ($p = 0,399$) and old animals at early ($p = 0,385$) or late explantation ($p = 0,142$) shows no significant differences.

Mean collagen content in former wound area of young treated mice with 56,76% lies nearby the control group with 56,67% ($p = 0,495$). At early explantation the tests in the group of old mice reach with 45,8% higher values as controls with 35,89%, but this difference is without significance ($p = 0,145$). At the time of late explantation both treatment groups are on the same level again ($p = 0,471$).

Also there exists no significant difference between percentual vessel volume of young treated animals with 5,43% and controls with 6,44% ($p = 0,26$). A similar situation can be observed in old mice, where sham-irradiated mice at early (3,09%) and late (6,6%) date of explantation reach higher percentual vessel volumes as the corresponding treatment group (early: 2,9%; late: 4,73%). But differences are also not significant (early: $p = 0,451$; late: $p = 0,095$). The percentual vessel volumes in former wound area of young test- and control group are respectively higher as the ones of old tests and controls (test: $p = 0,024$; control: $p = 0,04$).

7. Literaturverzeichnis

1. Albrecht-Buehler G. Surface extensions of 3T3 cells towards distant infrared light sources. *J Cell Biol.* 1991; 114: 493-502.
2. Allen DB, Maguire JJ, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, Chang M, Le AX, Hopf HW, Hunt TK. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg.* 1997; 132: 991-996.
3. Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, Frenk E, Hohlfeld P, Schwarzkopf S. Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: implications in skin repair. *Int J Mol Med.* 2000; 5: 247-251.
4. Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res.* 1998; 55: 260-270.
5. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *J Anat.* 1995; 187: 1-26.
6. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol.* 1997; 108: 430-437.
7. Asmussen P, Söllner B. Wound care. Principles of Wound Healing. Stuttgart: Hippokrates; 1993.
8. Assadian O, Daeschlein G, Kramer A. The importance of infected problem wounds for the hygienist and microbiologist and economic aspects of chronic wounds. *GMS Ger. Med. Sci.* 2006; 1(1): Doc30. [zitiert am 22.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2006-1/dgkh000030.shtml>
9. Bachern A, Reed CI. The penetration of light through human skin. *Amer J Physiol.* 1931; 97: 86-91.

10. Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2841-2849.
11. Billingham RE, Russell PS. Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. *Ann Surg.* 1956; 144: 961-981.
12. Böcker, W, Denk H, Heitz Ph U. Entzündung. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph U, Hrsg. *Pathologie.* 2. Aufl. München und Jena: Urban & Fischer-Verlag; 2001: 69-99.
13. Boldstar Infrared Services. Boldstar Infrared Services helps zoo staff with ailing elephant. 04.04.2003 [zitiert am 06.05.2009]. URL: http://www.boldstarinfrared.com/elephant_boldstar.pdf
14. Branski LK, Herndon DN, Jeschke MG. Gentherapie mit Wachstumsfaktoren - ein neuer therapeutischer Ansatz für akute und chronische Wunden? *Chir Gastroenterol.* 2006; 22: 169-174
15. Brem H, Tomic-Canic M, Entero H, Hanflik AM, Wang VM, Fallon JT, Ehrlich HP. The synergism of age and db/db genotype impairs wound healing. *Exp Gerontol.* 2007; 42: 523-531.
16. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11: 281-288.
17. Catty RH. Healing and contraction of experimental full-thickness wounds in the human. *Br J Surg.* 1965 Jul; 52: 542-548.
18. Cobarg CC. Physikalische Grundlagen der wassergefilterten Infrarot-A-Strahlung. In: Vaupel P, Krüger W, Hrsg. *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung: Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten.* 2.Aufl. Stuttgart: Hippokrates; 1995: 19-28.
19. Cohen BJ, Cutler RG, Roth GS. Accelerated wound repair in old deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J Gerontol.* 1987; 42: 302-307.
20. Colak A, Polat B, Okumus Z, Kaya M, Yanmaz LE, Hayirli A. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 4244-4248.

21. Constant JS, Feng JJ, Zabel DD, Yuan H, Suh DY, Scheuenstuhl H, Hunt TK, Hussain MZ. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen.* 2000; 8: 353-360.
22. Cuthbertson AM. Contraction of full thickness skin wounds in the rat. *Surg Gynecol Obstet.* 1959; 108: 421-432.
23. Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001; 17: 261-265.
24. Dauncey MJ, Ingram DL. Evaluation of the Effects of environmental temperature and nutrition on growth and development. *J Agric Sci* 1983; 101: 351-358
25. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: 1-11.
26. DeFranzo AJ, Argenta LC, Marks MW, Molnar JA, David LR, Webb LX, Ward WG, Teasdall RG. The use of vacuum-assisted closure therapy for the treatment of lower-extremity wounds with exposed bone. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 108: 1184-1191.
27. DIPO Deutsches Institut für Pferdeosteopathie. Osteopathie und Physiotherapie: Physikalische Therapie. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.osteopathiezentrum.de/58-0-Physikalische-Therapie.html>.
28. DSI Deutsches Sofia Institut am Institut für Raumfahrtssysteme der Universität Stuttgart. Bildungsprogramm. Last updated 16/7/2008 [zitiert am 23.04.2009]. URL: <http://www.dsi.uni-stuttgart.de/bildungsprogramm/ir-strahlung/entdeckung.html>
29. Durrant BS, Ravida N, Spady T, Cheng A. New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology.* 2006; 66: 1729-1736.
30. Du Noüy PL. Cicatrization of Wounds. III. The relation between the age of the patient, the area of the wound and the index of cicatrization. *J Exp Med.* 1916; 24: 461-470.
31. Eddy AL, Van Hoogmoed LM, Snyder JR. The role of thermography in the management of equine lameness. *Vet J.* 2001; 162: 172-181.

32. Ehrlicher A, Betz T, Stuhmann B, Koch D, Milner V, Raizen MG, Kas J. Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 16024-16028.
33. Enoch S, Price P. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. Last updated 8/2004 [zitiert am 15.03.2009] URL: <http://www.worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html>
34. Ershler WB, Gamelli RL, Moore AL, Hacker MP, Blow AJ. Experimental tumors and aging: local factors that may account for the observed age advantage in the B16 murine melanoma model. *Exp Gerontol*. 1984; 19: 367-376.
35. Festing MF, Blackmore DK. Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats. *Lab Anim*. 1971; 5: 179-192.
36. Fonseca B, Alves A, Nicoletti J, Thomassian A, Hussni C, Mikail S. Thermography and ultrasonography in back pain diagnosis of equine athletes. *J. Equine Vet. Sci*. 2006; 26: 507-516.
37. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971; 27: 549-550.
38. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol*. 2004; 164: 1935-1947.
39. Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004; 12: 485-492.
40. Gerngroß H, Minholz R. Wundheilung: Kritischer Bericht zur Situation in Deutschland. *Trauma Berufskrankh*. 2001; 3: 32-36.
41. Goodson WH 3rd, Hunt TK. Wound healing and aging. *J Invest Dermatol*. 1979; 73: 88-91.
42. Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J Surg*. 2003; 186: 259-263.

43. Gordillo GM, Roy S, Khanna S, Schlanger R, Khandelwal S, Phillips G, Sen CK. Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008; 35: 957-964.
44. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg*. 2004; 28: 321-326.
45. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol*. 1994; 124: 401-404.
46. Hammersen F, Osterkamp-Baust U, Endrich B. Ein Beitrag zum Feinbau terminaler Strombahnen und ihrer Entstehung in bösartigen Tumoren. In: Vaupel P, Hammersen F, Hrsg. *Mikrozirkulation in malignen Tumoren*. 1. Aufl. Basel: Karger AG; 1983: 15-51.
47. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ*. 2002; 324: 160-163.
48. Hartel M, Hoffmann G, Wente MN, Martignoni ME, Büchler MW, Friess H. Randomized clinical trial of the influence of local water-filtered infrared A irradiation on wound healing after abdominal surgery. *Br J Surg*. 2006; 93: 952-960.
49. Hartel M, Illing P, Mercer JB, Lademann J, Daeschlein G, Hoffmann G. Therapy of acute wounds with water-filtered infrared-A (wIRA). *GMS Ger. Med. Sci*. 2007; 2(2): Doc53. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000086.shtml>.
50. Hayward PG, Robson MC. Animal models of wound contraction. *Prog Clin Biol Res*. 1991; 365: 301-312.
51. Hellige G, Becker G, Hahn G. Temperaturverteilung und Eindringtiefe wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung. In: Vaupel P, Krüger W, Hrsg. *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung: Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten*. 2.Aufl. Stuttgart: Hippokrates; 1995: 63-80.
52. Hilsberg S. Infrarot-Thermografie bei Zootieren: erste Erfahrungen im Einsatz zur Trächtigkeits- und Entzündungsdiagnostik. *Bongo*, Berlin 1998; 28: 1-8.

53. Hoffmann G. Water-filtered infrared A (wIRA) for the improvement of wound healing. [Übersichtsarbeit] *GMS Ger. Med. Sci.* 2006; Vol. 1(1): Doc20. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2006-1/dgkh000020.shtml>
54. Hoffmann G. Principles and working mechanisms of water-filtered infrared-A (wIRA) in relation to wound healing. *GMS Ger. Med. Sci.* 2007; Vol. 2(2): Doc54. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000087.shtml>
55. Holm-Pedersen P, Zederfeldt B. Strength development of skin incisions in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1971; 5: 7-12.
56. Holm-Pedersen P, Viidik A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1972; 6: 24-35.
57. Holm-Pedersen P, Fenstad AM, Folke LE. DNA, RNA and protein synthesis in healing wounds in young and old mice. *Mech Ageing Dev.* 1974; 3: 173-185.
58. Hopf HW, Hunt TK, West JM, Blomquist P, Goodson WH, Jensen JA, Jonsson K, Paty PB, Rabkin JM, Upton RA, von Smitten K, Whitney JD. Wound tissue oxygen tension predicts the risk of wound infection in surgical patients. *Arch Surg.* 1997; 132: 997-1004.
59. Hübner C. Wundbehandlung bei Hund und Katze: Unter besonderer Berücksichtigung von Biss- und Abrasionsverletzungen. [Dissertation]. Gießen. Justus-Liebig-Universität, 2009.
60. Hunt TK, Conolly WB, Aronson SB, Goldstein P. Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. *Am J Surg.* 1978; 135: 328-332.
61. Hydrosun Medizintechnik GmbH, Präsentation. Die Wärme der Evolution: Das Sonnen-Atmosphären-System. Entstehung und Wirkung der wassergefilterten Infrarot-Strahlung (wIRA). 07.09.2001 [zitiert am 06.05.2009] URL: http://www.eumedics.at/html/index.aspx?view=detail&detail=197&mid=176&cat=176&page_url=Produkte

62. Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol.* 1991; 3: 841-848.
63. Jacobs S, Simhaee DA, Marsano A, Fomovsky GM, Niedt G, Wu JK. Efficacy and mechanisms of vacuum-assisted closure (VAC) therapy in promoting wound healing: a rodent model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2008.03.024>.
64. Jelkmann W. Blut. In: Schmidt R, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 29. Aufl. Heidelberg: Springer; 2005: 510-550.
65. Jeremy J, Dashwood M. Microvascular Repair. In: Shepro D, Hrsg. *Microvascular Research: Biology and Pathology Volume 2.* 1. Edit. Burlington USA, San Diego USA, London UK: Elsevier Academic Press; 2006: 903-914.
66. Kalinowski S. Der Einfluss von Infrarot-C-Strahlung auf Rückenbeschwerden bei Reitpferden nach Behandlung in einem Thermium. [Dissertation]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2007.
67. Kastberger G, Stachl R. Infrared imaging technology and biological applications. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 2003; 35: 429-439.
68. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 49: 1-17.
69. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Cell attachment to extracellular matrices is modulated by pulsed radiation at 820 nm and chemicals that modify the activity of enzymes in the plasma membrane. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 274-281.
70. Keswani SG, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A, Alae D, Herlyn M, Crombleholme TM. Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* 2004; 12: 497-504.
71. Kiritsy CP, Lynch AB, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 729-760.
72. Krüger U, Wolfrum F. Wunde. In: Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B, Hrsg. *Duale Reihe Chirurgie.* 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007: 138-160.

73. LaVan FB, Hunt TK. Oxygen and wound healing. Clin Plast Surg. 1990; 17: 463-472.
74. Leaming DB. The influence of age on wound healing. J Surg Res. 1963; 3: 43-47.
75. Lee BY, Wendell K, Al-Waili N, Butler G. Ultra-low microcurrent therapy: a novel approach for treatment of chronic resistant wounds. Adv Ther. 2007; 24: 1202-1209.
76. Les EP. Personal communication and effect of pasteurized diets on lifespan of inbred mice. J Immunol. 1969; 110: 139-143.
77. Melis P, Noorlander ML, van der Horst CM, van Noorden CJ. Rapid alignment of collagen fibers in the dermis of undermined and not undermined skin stretched with a skin-stretching device. Plast Reconstr Surg. 2002; 109: 674-680.
78. Menezes S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity. J Invest Dermatol. 1998; 111: 629-633.
79. Mercer JB, de Weerd L. The effect of water-filtered infrared-A (wIRA) irradiation on skin temperature and skin blood flow as evaluated by infrared thermography and scanning laser Doppler imaging. Thermology International 2005; 15: 89-94.
80. Mercer JB, Nielsen SP, Hoffmann G. Improvement of wound healing by water-filtered infrared-A (wIRA) in patients with chronic venous stasis ulcers of the lower legs including evaluation using infrared thermography. GMS Ger. Med. Sci. 2008; 6: Doc11. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/gms/2008-6/000056.shtml>
81. Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. Curr Probl Dermatol. 1978; 7: 39-52.
82. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing: An overview. Clin Plast Surg. 2003; 30: 1-12.
83. Montagna W, Yun JS. The skin of the domestic pig. J Invest Dermatol. 1964; 42: 11-21.

84. Montandon D, D'andiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Surg.* 1977; 4: 325-346.
85. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg.* 1997; 38: 553-562.
86. Nielsen OS, Horsman M, Overgaard J. A future for hyperthermia in cancer treatment? *Eur J Cancer.* 2001; 37: 1587-1589.
87. Peacock EE. Contraction. In: Peacock EE, Hrsg. *Wound Repair.* Philadelphia: W. B. Saunders; 1984.
88. Otten V. Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit von Bakterienzellulose als Wundauflage in der Veterinärmedizin. [Disseration]. Gießen. Justus-Liebig-Universität, 2005.
89. Perez R, Davis SC. Relevance of animal models for wound healing. *Wounds* 2008 [zitiert am 28.04.2009] URL: <http://www.woundsresearch.com/article/8200>
90. Pietramaggiori G, Liu P, Scherer SS, Kaipainen A, Prsa MJ, Mayer H, Newalder J, Alperovich M, Mentzer SJ, Konerding MA, Huang S, Ingber DE, Orgill DP. Tensile forces stimulate vascular remodeling and epidermal cell proliferation in living skin. *Ann Surg.* 2007; 246: 896-902.
91. Plisko A, Gilchrest BA. Growth factor responsiveness of cultured human fibroblasts declines with age. *J Gerontol.* 1983; 38: 513-518.
92. Prockop D, Kaplan A, Udenfriend S. Oxygen-18 studies on the conversion of proline to collagen hydroxyproline. *Arch Biochem Biophys.* 1963; 101: 499-503.
93. Purohit RC, McCoy MD. Thermography in the diagnosis of inflammatory processes in the horse. *Am J Vet Res.* 1980; 41: 1167-1174.
94. Quirinia A, Viidik A. The influence of age on the healing of normal and ischemic incisional skin wounds. *Mech Ageing Dev.* 1991; 58: 221-232.
95. Rainwater-Lovett K, Pacheco JM, Packer C, Rodriguez LL. Detection of foot-and-mouth disease virus infected cattle using infrared thermography. *Vet J.* 2009; 180: 317-324.

96. Reed MJ, Corsa A, Pendergrass W, Penn P, Sage EH, Abrass IB. Neovascularization in aged mice: delayed angiogenesis is coincident with decreased levels of transforming growth factor beta1 and type I collagen. *Am J Pathol.* 1998; 152: 113-123.
97. Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 87: 145-153.
98. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation.* 1999; 99: 111-120.
99. Röhlinger P, Grunow C, Börnert D. Results of no-contact measurement of surface temperature in swine. *Arch Exp Veterinärmed.* 1980; 34: 759-766.
100. Rose EH, Vistnes LM, Ksander GA. The panniculus carnosus in the domestic pig. *Plast Reconstr Surg.* 1977; 59: 94-97.
101. Rümelin A, Jaehde U, Kerz T, Roth W, Krämer M, Fauth U. Early postoperative substitution procedure of the antioxidant ascorbic acid. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 104-108.
102. Rytz U. Wunde, Wundheilung. In: Kramer M, Hrsg. *Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie.* 1. Aufl. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft, 2004: 274-277.
103. Rzeznik J. Die Technik zur loko-regionalen Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung. In: Vaupel P, Krüger W, Hrsg. *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung: Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten.* 2. Aufl. Stuttgart: Hippokrates; 1995: 29-46.
104. Sabiston D. *Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice.* 15. Aufl. St. Louis: Saunders; 1997: 209.
105. Salcido R, Popescu A, Ahn C. Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med.* 2007; 30: 107-116.
106. Schabel E. Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung: Erste Erfahrungen in der Anwendung. *Kleintier Konkret.* 2009; S1: 23-24.

107. Sedlarik K. M. Die Prozesse der Wundheilung. Hartmann WundForum. 1994; 1: 10-15.
108. Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. Arch Surg. 2000; 135: 1293-1297.
109. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999; 341: 738-746.
110. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. Am J Surg. 1998; 176: 26-38.
111. Stewart M, Webster JR, Verkerk GA, Schaefer AL, Colyn JJ, Stafford KJ. Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. Physiol Behav. 2007; 92: 520-525.
112. Strauch B, Patel MK, Navarro JA, Berdichevsky M, Yu HL, Pilla AA. Pulsed magnetic fields accelerate cutaneous wound healing in rats. Plast Reconstr Surg. 2007 Aug; 120:425-430.
113. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. Wound Repair Regen. 2001; 9: 66-76.
114. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. Lab Invest. 1999; 79: 1479-1487.
115. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. J Invest Dermatol. 2001; 117: 1027-1035.
116. Thiede A, Debus S. Die Wunde. In: Berchtold R, Hrsg. Chirurgie. 5. Aufl. München und Jena: Urban & Fischer; 2006: 45-62.
117. Turner TA, Fessler JF, Lamp M, Pearce JA, Geddes LA. Thermographic evaluation of horses with podotrochlosis. Am J Vet Res. 1983; 44: 535-539.
118. Turner TA. Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. Vet Clin North Am Equine Pract. 1991; 7: 311-338.
119. Turner TA. Diagnostic thermography. Vet Clin North Am Equine Pract. 2001; 17: 95-113.
120. Van de Kerkhof PC, Van Bergen B, Spruijt K, Kuiper JP. Age-related changes in wound healing. Clin Exp Dermatol. 1994; 19: 369-374.

121. Van Hoogmoed LM, Snyder JR. Use of infrared thermography to detect injections and palmar digital neurectomy in horses. *Vet J.* 2002; 164: 129-141.
122. Vaupel P, Stofft E. Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung im Vergleich zu konventioneller Infrarotstrahlung oder Fango-Paraffin-Packungen: Temperaturprofile bei lokaler Wärmetherapie. In: Vaupel P, Krüger W, Hrsg. *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung: Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten.* 2.Aufl. Stuttgart: Hippokrates; 1995: 135-148.
123. Visser C. Mäuse. In: Gabrisch K, Zwaart P, Sassenburg L, Fehr M, Hrsg. *Krankheiten der Heimtiere.* 6. Aufl. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft; 2005: 109-132.
124. von Felbert V, Schuhmann H, Mercer JB, Strasser W, Daeschlein G, Hoffmann G. Therapy of chronic wounds with water-filtered infrared-A (wIRA). *GMS Ger. Med. Sci.* 2007, 2(2): Doc52. [zitiert am 23.04.2009] URL: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2008-2/dgkh000085.shtml>.
125. Warriss PD, Pope SJ, Brown SN, Wilkins LJ, Knowles TG. Estimating the body temperature of groups of pigs by thermal imaging. *Vet Rec.* 2006; 158: 331-334.
126. Weil M, Litzke LF, Fritsch R. Diagnostic validity of thermography of lameness in horses. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 1998; 26: 346-354.
127. Wolloscheck T, Gaumann A, Terzic A, Heintz A, Junginger T, Konerding MA. Inguinal hernia: measurement of the biomechanics of the lower abdominal wall and the inguinal canal. *Hernia.* 2004 Aug; 8(3):233-241.
128. Yamaura H, Matsuzawa T. Decrease in capillary growth during aging. *Exp Gerontol.* 1980; 15: 145-150.
129. Yonezawa Y, Kondo H, Nomaguchi TA. Age-related changes in serotonin content and its release reaction of rat platelets. *Mech Ageing Dev.* 1989; 47: 65-75.

8. Anhang

8.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe zunächst dreimal à zehn Minuten in Xylol (E. Merck, Darmstadt, Deutschland), danach jeweils zweimal in Folge à fünf Minuten in Isopropanol 98%, Isopropanol 96% und Isopropanol 80% (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) entparaffiniert. Nach einer fünfminütigen Spülung in Aqua dest. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland), erfolgte die zehnminütige Färbung in Hämatoxilin (Haemalaun Sigma MHS-32, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) nach Mayer. Im Anschluss wurden die Präparate 10 min im Leitungswasser gebläut und dann fünf Minuten in Eosin (Eosin Sigma HAT 110232, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Nach der Spülung in Aqua dest., folgte eine Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration mit einmalig Isopropanol 80%, zweimalig Isopropanol 96% (jeweils kurz) und zweimalig Isopropanol 98% à fünf Minuten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal à fünf Minuten in Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt.

8.2 Pikrin-Siriusrotfärbung

Die Schnitte wurden zunächst in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend 30 min mit 0,1% Siriusrot in 1,2%iger Pikrinsäurelösung gefärbt. Danach erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. und eine Entwässerung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe.

8.3 CD 31-Immunhistochemie

Die Schnitte wurden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte die Spülung mit destilliertem Wasser. Durch Inkubation in Peroxidase Blocking Solution (S2023, Fa. Dako) wurde die endogene Peroxidase inaktiviert, um so spätere unspezifische Färbereaktionen im Gewebe zu vermeiden. Nach der Spülung mit PBS-Puffer, wurde das Gewebe mit dem unkonjugierten primären monoklonalen Antikörper CD 31 (Pecam-1 MEC13.3 für Mausgewebe Santa Cruz sc18916) in einer 1:200 Verdünnung (Antikörper-Verdünnungsserum S 2022, Fa. Dako) 60 min lang inkubiert. Nach einer erneuten Spülung mit PBS, folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (Rabbit-Anti-Rat E 0468 der Fa. Dako). Dieser bindet an das Fc-Fragment des primären Antikörpers und lokalisiert somit vorherige spezifische Reaktionen des primären Antikörpers mit dem CD-31-Antigen im Gewebe. Anschließend verbleibt das Gewebe für 30 min in einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite PK 6100). Durch die hohe Affinität von Avidin zu den vier freien Bindungsstellen des Biotin, entsteht eine nahezu irreversible Bindung zwischen Avidin und dem Biotin des sekundären Antikörpers. Durch anschließende fünfminütige Zugabe des Peroxidasesubstrates Diaminobezidin (3,3'-Diaminobezidin-Tetrahydrochlorid, DAB+ K 3468 der Fa. Dako) entsteht durch enzymatische Umsetzung des Chromogens ein in Alkohol unlösliches stabiles Endprodukt, welches in Form eines braunen Farbniederschlags im Präparat sichtbar wird. Nach Kontrolle des Färbeargebnisses unter dem Mikroskop, wurde mit Hämatoxilin nach Mayer gegengefärbt, danach für 10 Minuten in Leitungswasser gebläut, in Alkohol und Xylol entwässert und zuletzt mit Entellan eingedeckt.

Danksagungen

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Moritz A. Konerding für seine geduldige und kompetente Betreuung, die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und seine persönliche Unterstützung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Kramer danke ich besonders für die Unterstützung und Bereitschaft, diese extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten.

Daneben möchte ich mich bei Herrn em. Univ.-Prof. Dr. Vaupel und Frau PD Dr. rer. nat. (GB) et med. habil. D. Bickes-Kelleher für die Überlassung des Themas sowie das Interesse und die Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Frau Bahr für ihre Arbeit und Hilfe.

Schließlich bedanke ich mich bei der Dr. med. h.c. Erwin-Braun-Stiftung, Basel, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Leihgabe der Infrarotkamera.

Außerdem danke ich meinen Eltern, die mir stets bestärkend zur Seite standen und mir den Rückhalt für das Anfertigen dieser Arbeit gaben.

Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5503-9



9 783835 195503